

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

URČENÍ POLOHY DVOJNÉ VAZBY U VOSKOVÝCH
ESTERŮ POMOCÍ DIMETHYLDISULFIDOVÉ
DERIVATIZACE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF DOUBLE BOND POSITION IN
WAX ESTERS BY DIMETHYL DISULFIDE
DERIVATIZATION AND MASS SPECTROMETRY

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Martina Háková

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857, výzkumného záměru Z4 055 0506 a grantu GA ČR č. 203/09/0139.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele (konzultanta) RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D. a RNDr. Karoliny Peckové, Ph.D. (školitele), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště školitele RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (a pracoviště školitele RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.).

V Praze dne

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala celé své rodině, především rodičům a své sestře, kteří mi byli po celou dobu studia velikou oporou.

Mé poděkování patří i mému školiteli RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za odborné vedení, velikou ochotu a cenné rady a připomínky při vypracovávání této diplomové práce.

RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. bych ráda poděkovala za ochotu a cenné připomínky k diplomové práci.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala i celému týmu Hmotnostní spektrometrie v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za jejich ochotu, pomoc a praktické rady a za vytvoření přátelské atmosféry.

ABSTRAKT

Voskové estery jsou významnou součástí přírodních vosků, které můžeme nalézt v mnoha živých organismech. Vlastnosti lipidů, včetně voskových esterů, mohou být podstatně ovlivněny polohou dvojné vazby. V této diplomové práci byla k určení polohy dvojné vazby využita dimethyldisulfidová (DMDS) derivatizace následovaná detekcí pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) a s ionizací elektrosprejem (ESI). Podařilo se změřit APCI a ESI MS/MS spektra 8 různých voskových esterů lišících se polohou dvojné vazby. Ve spektrech byly identifikovány diagnostické ionty polohy dvojné vazby. Těto metody by bylo možné využít při HPLC/MS analýzách voskových esterů, které nelze analyzovat pomocí GC/MS. Ukázalo se, že DMDS derivatizační reakce s hmotnostní detekcí s APCI ionizací je vhodná i pro určení polohy dvojné vazby u alkenů.

ABSTRACT

Wax esters are substantial constituents of natural waxes, which can be found in many living organisms. Properties of lipids, including wax esters, may be significantly influenced by the position of double bond. In this diploma thesis the location of double bonds was determined by dimethyl disulfide (DMDS) derivatization followed by detection using tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI). We managed to measure the APCI and ESI MS/MS spectra of 8 different wax esters with different position of double bond. Diagnostic ions determining double bond position were identified. This method could be used in HPLC/MS analysis of wax esters, which cannot be analyzed by GC/MS. It was shown that the DMDS derivatization reaction and mass detection with APCI ionization is also suitable for locating double bonds in alkenes.

Předmětová hesla

Určení polohy dvojné vazby

Dimethyldisulfidová derivatizace (DMDS)

Hmotnostní spektrometrie voskových esterů

Klíčová slova

Nenasycené voskové estery

Dimethyldisulfid

Ionizace elektrosprejem (ESI)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

OBSAH:

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	9
1 ÚVOD.....	10
1.1 CÍL PRÁCE.....	10
2 TEORETICKÝ ÚVOD.....	12
2.1 LIPIDY	12
2.2 VOSKOVÉ ESTERY.....	13
2.2.1 Struktura	13
2.2.2 Zkratky a názvosloví.....	14
2.2.3 Výskyt a funkce	14
2.3 DERIVATIZACE DVOJNÉ VAZBY	15
2.3.1 Derivatizační metody	16
2.3.1.1 Epoxidace	16
2.3.1.2 Oxidace OsO_4	16
2.3.1.3 Diels-Alderova reakce	17
2.3.1.4 Methoxymerkurace-demerkurace.....	17
2.3.1.5 Bromace	17
2.3.2 Dimethyldisulfidová derivatizace	17
2.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	19

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ	23
3.2	POUŽITÝ MATERIÁL	24
3.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ	24
3.3.1	Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem	24
3.3.1.1	Podmínky GC/MS analýz	25
3.3.2	Hmotnostní spektrometr	25
3.3.3	Další přístroje.....	26
3.4	METODIKA MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	26
3.4.1	Příprava standardů voskových esterů	26
3.4.2	Tenkvrstevná chromatografie	26
3.4.2.1	Analytická tenkovrstevná chromatografie.....	26
3.4.2.2	Preparativní tenkovrstevná chromatografie.....	27
3.4.3	Měření čistoty standardů voskových esterů	27
3.4.4	Optimalizace DMDS derivatizační reakce	27
3.4.5	GC/MS měření DMDS derivátů voskových esterů	28
3.4.6	Měření MS/MS spekter DMDS derivátů voskových esterů s použitím APCI a ESI ionizace.....	28
3.4.6.1	Měření s použitím APCI ionizace	29
3.4.6.2	Měření s použitím ESI ionizace	29
3.4.7	Měření MS/MS spekter standardu alkenu	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	SYNTÉZA VOSKOVÝCH ESTERŮ.....	31

4.2	OPTIMALIZACE DERIVATIZAČNÍ REAKCE	32
4.3	GC/MS MĚŘENÍ DMDS DERIVÁTŮ VOSKOVÝCH ESTERŮ	33
4.4	MS/MS MĚŘENÍ DMDS DERIVÁTŮ VOSKOVÝCH ESTERŮ	37
4.4.1	Optimalizace nastavení iontových zdrojů	37
4.4.1.1	Optimalizace nastavení APCI zdroje	37
4.4.1.2	Optimalizace nastavení ESI zdroje	39
4.4.2	Měření MS/MS spekter DMDS derivátů voskových esterů při optimálních podmínkách...	44
4.5	MS/MS MĚŘENÍ DMDS DERIVÁTU STANDARDU ALKENU	51
5	ZÁVĚR	53
	LITERATURA	54
	PŘÍLOHY	58

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	Adenosintrifosfát
DMDS	Dimethyldisulfid
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
m/z	Poměr hmotnosti k náboji
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
TLC	Tenkvrstevná chromatografie

1 ÚVOD

Lipidy jsou složkami všech buněk, mají zásadní význam pro přežití od nejmenších mikroorganismů až po největší rostliny a nejvíce vyvinuté živočichy. Mají svou roli jako signální molekuly, jako energetické zásobárny a regulují biofyzikální vlastnosti membrán [1-3]. Poruchy v metabolismu lipidů jsou spojovány s mnoha převládajícími nemocemi, zahrnujícími diabetes druhého typu [4-7], depresi [8,9] a rakovinu [10,11].

Malé změny v chemické struktuře lipidů mohou způsobit změny fyzikálních a biofyzikálních vlastností molekul. Například v případě esenciálních mastných kyselin je pozicí uhlíkových dvojných vazeb dán jejich metabolický osud [12].

Je tedy patrné, že znalost polohy dvojně vazby u lipidů může mít zásadní význam pro biochemii. Pro tuto práci byly jako modelové lipidy zvoleny voskové estery obsahující ve své struktuře jednu dvojnou vazbu. Snahou bylo nalézt optimální podmínky pro hmotnostní detekci dimethyldisulfidových derivátů nenasycených voskových esterů, které by pak mohly být ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií využity pro analýzu komplexních přírodních lipidových směsí.

1.1 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce je vývoj metody pro určení polohy dvojně vazby u voskových esterů pomocí dimethyldisulfidové derivatizace a tandemové hmotnostní spektrometrie s použitím chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a ionizace elektrosprejem (ESI). Vývoj metody probíhal v několika etapách.

První etapou byla syntéza standardů voskových esterů lišících se polohou dvojně vazby.

Dále byly optimalizovány podmínky pro dimethyldisulfidovou derivatizaci voskových esterů, tak aby výtěžek reakce byl co největší v co nejkratším čase.

Poté byly optimalizovány podmínky pro měření dimethyldisulfidových derivátů voskových esterů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s použitím APCI a ESI ionizace.

Následovala derivatizace standardů voskových esterů za optimálních podmínek a měření jejich fragmentačních spekter.

V posledním kroku byla změřena fragmentační spektra dimethyldisulfidového derivátu standardu alkenů.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 LIPIDY

Definice skupiny lipidů není zcela jasná, existuje mnoho způsobů, jak tuto skupinu látek definovat. Jednou z nejběžnějších definicí je ta, která popisuje lipidy jako přírodní nepolární sloučeniny, které jsou téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné v jiných nepolárních rozpouštědlech [13]. Tato definice však není zcela přesná, jelikož látky dnes běžně považované za lipidy mohou být rozpustné jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech. Přesnější definice považuje lipidy za mastné kyseliny a jejich deriváty, a látky spojené biosynteticky či funkčně s těmito sloučeninami [14]. Možná je také definice označující lipidy jako malé hydrofobní nebo amfipatické molekuly, které zcela nebo částečně vznikají kondenzací z thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy atd.) anebo z isoprenových jednotek (prenoly, steroly) [15].

Hlavními biologickými funkcemi lipidů jsou [13]:

- Součást biologických membrán
- Hlavní zásobní forma uhlíku a energie
- Prekurzory dalších důležitých látek (vitaminů, hormonů, regulačních látek)
- Izolační bariéra vůči teplotnímu, elektrickému nebo jinému fyzikálnímu šoku
- Ochranný obal organismů či buněk vůči infekci nebo dehydrataci

Jedno z nejaktuálnějších členění lipidů třídí lipidy do těchto strukturních skupin [15]:

- Mastné kyseliny
- Glycerolipidy
- Glycerofosfolipidy
- Sfingolipidy

-
- Steroly
 - Prenoly
 - Sacharolipidy
 - Polyketidy

Jiná klasifikace dělí lipidy do tří hlavních skupin [16]:

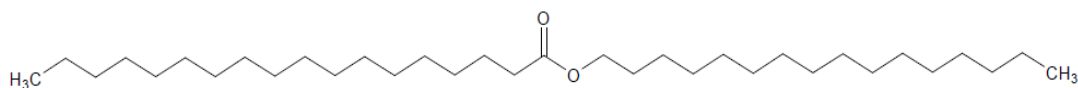
- Jednoduché lipidy
 - Při hydrolýze poskytují maximálně dva typy látek. Do této skupiny se řadí i voskové estery.
- Komplexní lipidy
 - Při hydrolýze poskytují tři a více složek. Lze rozdělit do tří hlavních podskupin: fosfolipidy, glykolipidy, lipoaminové kyseliny.
- Proteolipidy
 - Patří sem sloučeniny proteinů a mastných kyselin.

Voskové estery se řadí do skupiny jednoduchých lipidů.

2.2 VOSKOVÉ ESTERY

2.2.1 Struktura

Voskové estery jsou tvořeny dlouhými řetězci mastných alkoholů a mastných kyselin, které jsou spojeny esterovou vazbou (**obrázek 1**). Tyto řetězce mohou být nasycené či nenasycené, případně mohou být větvené. U různých druhů organismů se struktura může lišit [17].



Obrázek 1

Struktura palmitylstearátu.

2.2.2 Zkratky a názvosloví

Pro jednoduché a jasné pojmenování voskových esterů je v této práci použito zkrácené názvosloví pro obě části molekuly, které je běžně používáno v biochemii. První část zkratky odkazuje na alkoholovou část molekuly, druhá část zkratky odpovídá mastné kyselině a “n” vyjadřuje polohu první dvojné vazby počítáno od konce řetězce. Například zkratka 16:0–18:1n-9 odpovídá názvu hexadecyloktadec-9-enoát (palmityl oleát).

2.2.3 Výskyt a funkce

Voskové estery jsou součástí přírodních vosků, které můžeme nalézt v mnoha živých organismech. Vosky zajišťují mnoho funkcí [17].

Listy rostlin jsou pokryté tenkou vrstvou vosku [18]. Tato vrstva tvoří vnější vrstvu kutikulární membrány, jedná se o rozhraní mezi rostlinou a atmosférou. Tato vrstva má mnoho účelů, například omezení odpařování vody, také umožňuje vypouštění těkavých látek, které mohou odstrašovat hmyz či lákat opylující hmyz. Vosk funguje jako ochrana před nemocemi a hmyzem a pomáhá rostlinám přežít období sucha [17]. U jojobových semen slouží voskové estery jako zásoba energie [18]. Unikátním producentem voskových esterů je v rostlinné říši palma *Copernicia prunifera*. Její listy pokrývá karnaubský vosk, který z osmdesáti pěti procent tvoří voskové estery [17].

V mořských organismech mají voskové estery funkci především jako energetická zásoba mastných kyselin, jež jsou dále určeny k oxidaci, a které poskytují energii ve formě adenosintrifosfátu (ATP), nebo pro biosyntézu fosfolipidů [19]. Voskovým esterům byla věnována pozornost i při výzkumu vodního planktonu a to z důvodu jejich funkce jako klíčových sloučenin pro uskladnění energie. Uvažuje se o nich také jako o potenciálních ukazatelích pro sledování začlenění kontinentálních vyšších rostlin do mořského prostředí [20].

Voskové estery se také mohou vyskytnout jakou součástí chemické komunikace u hmyzu, byly objeveny jako součást sekretu labiální žlázy u čmeláků [21]. Také včely mají žlázy, které produkují vosk s vysokým obsahem voskových esterů (35-80%). Tento vosk pak používají k výstavbě včelích pláství [17].

Savci také produkují voskové estery, zdá se ale, že jediným zdrojem jsou zde mazové žlázy. Většina těchto žláz je spojena s vlasovými a chlupovými váčky. Maz, který je těmito žlázami produkován, obsahuje převážně nepolární lipidy. Byl studován u několika druhů savců a z analýz je patrné, že lidský maz se odlišuje od ostatních druhů [17]. U kytovců lze objevit voskové estery ve sluchových tkáních, voskové estery tak hrají roli při echolokaci u těchto savců [22].

Svou funkci mají voskové estery i u ptáků, kde se nacházejí jako součást vosku, který ptáci produkují, především jako voděodolnou vrstvu chránící jejich peří. Spekuluje se i o dalších funkcích tohoto ptačího vosku [17].

U člověka můžeme nalézt voskové estery jako součást mazu vylučovaného mazovými žlázami. Mazové žlázy se vyskytují po celém lidském těle kromě dlaní a chodidel. Početný je výskyt především v oblasti obličeje a vlasů, naopak poměrně řídký je výskyt v oblasti zad. Tyto žlázy mohou postihnout různé poruchy, jejichž následkem pak jsou tyto nemoci: akné, mastná pleť, mazový karcinom. Podíl voskových esterů je v tomto mazu asi 26 %. Příčina odlišnosti složení mazu u člověka od ostatních savců není známa. U člověka není zcela známa funkce mazu [23]. Mezi mazové žlázy patří i tarzální žlázy nalézající se na kraji očních víček. Sekret tarzálních žláz slouží jako ochrana oka. I v sekretu těchto žláz se vyskytují voskové estery [24]. Kromě mazových žláz lze ještě v lidském těle nelézt voskové estery v ušním mazu, zde je podíl voskových esterů asi devět procent [25].

Voskové estery jsou produkovány i průmyslově a používány ve velkém množství v kosmetických výrobcích, leštidlech, mazadlech apod. [17].

2.3 DERIVATIZACE DVOJNÉ VAZBY

Objasnění struktury nenasyčených sloučenin většinou vyžaduje určení uhlíkového skeletu, přítomnosti a počtu dvojných či trojných vazeb, určení jejich geometrie [26]. Tato práce se zaměřuje na určení polohy dvojně vazby. Většinou se k určení polohy dvojně vazby využívá derivatizačních metod.

2.3.1 Derivatizační metody

Derivatizaci dvojně vazby je možné provádět mnoha různými způsoby, přičemž každý způsob má své výhody i nevýhody. Způsoby derivatizace dvojně vazby se také liší svou aplikací, která závisí na charakteru látky, počtu dvojných vazeb nebo na druhu detekce [27-32].

2.3.1.1 Epoxidace

Určení polohy dvojně vazby je možné například využitím epoxidace. Jednou z variant je epoxidace v přítomnosti peroxykyselin [32, 33]. Tato metoda je vhodná pouze pro sloučeniny s jednou dvojnou vazbou. Ačkoliv charakteristické ionty v MS spektrech epoxidů z elektronové ionizace (EI) jsou nízké intenzity, je tato metoda využívána velmi často [26].

Ve většině případů jsou epoxidy vzniklé z alkenů před analýzou nejprve otevřením kruhu přeměněny na deriváty [26]. Jednou z možností otevření kruhu je aminolýza, která dává vzniknout aminoalkoholům [34]. Dále je možno otevřít epoxidový kruh pomocí chlorotrimethylsilanu nebo pomocí thiolů [26, 35]. Epoxidové skupiny lze také redukovat hydridem hlinito-lithným [26]. Je možno použít i hydrolytické štěpení za vzniku diolů, které pak musí být silylovány pro další GC/MS analýzy [26].

2.3.1.2 Oxidace OsO₄

Derivatizaci nenasycených sloučenin lze provést i s využitím OsO₄. Touto stereospecifickou oxidací vznikají dioly. Kyslíkové atomy oxidu osmičelého je možno chemicky značit, čímž se docílí snazší identifikace fragmentů vznikajících při GC/MS analýze [30]. V tomto případě je nutné vznikající dioly nechat dále reagovat, protože samotné dioly jsou poměrně polární sloučeniny, které nemají vhodné chromatografické vlastnosti pro GC/MS analýzu [26]. Po oxidaci tedy následuje další reakce. Tato reakce může být různého druhu, dle použitých reagentů [30-32, 36-38]. Jednou z možných reakcí diolů, vzniklých z reakce s oxidem osmičelým, je reakce s methanolem a hydridem sodným. Produktem reakce jsou pak methyletherové deriváty [32]. Reakce oxidu osmičelého může být také následována reakcí s acetonem. Produkty těchto reakcí jsou acetonidy. Fragmenty vznikající při GC/MS analýze umožňují jak určení polohy

dvojné vazby tak i určení geometrie dvojné vazby [30].

Další možností je reakce s trimethylsilanem. Využití trimethylsilyloxy derivátů je velmi vhodné především pro určení polohy dvojné vazby u mononenasycených sloučenin [31].

Jednou z dalších variant reakcí následujících po oxidaci je využití alkylboronátové či arylboronátové kyseliny, vznikají tak cyklické deriváty [37].

2.3.1.3 Diels-Alderova reakce

Další z možností derivatizace dvojné vazby je použití Diels-Alderovy reakce. Tento způsob derivatizace byl zkoumán u alkenů, které Diels-Alderovou reakcí tvořily adukty s ketalý tetrachlorcyklopentadienů. Detekce pak byla prováděna pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Výsledkem byla hmotnostní spektra, z kterých je možná jasná identifikace polohy dvojné vazby i její geometrie. Tento druh derivatizace je možné použít i pro mikrogramová množství analyzované látky [28]. Nevýhodou tohoto procesu je vznik směsi isomerů [26].

2.3.1.4 Methoxymerkurace-demerkurace

Při této reakci je vzorek zahříván pod zpětným chladičem s methanolem a s nadbytkem $\text{Hg}(\text{OCOCH}_3)_2$, následuje úprava pomocí NaBH_4 . Výsledná směs této derivatizační reakce je analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací [39,40]. Výhodou této reakce je, že na každou dvojnou vazbu připadá pouze jedna methoxy skupina. Metoda je těžko využitelná pro analýzy látek s mnoha dvojnými vazbami [26].

2.3.1.5 Bromace

V tomto případě se používá roztoku bromu v methanolu. Tato reakce je vhodná pro určení polohy dvojné vazby u mononenasycených i polynenasycených kyselin [41].

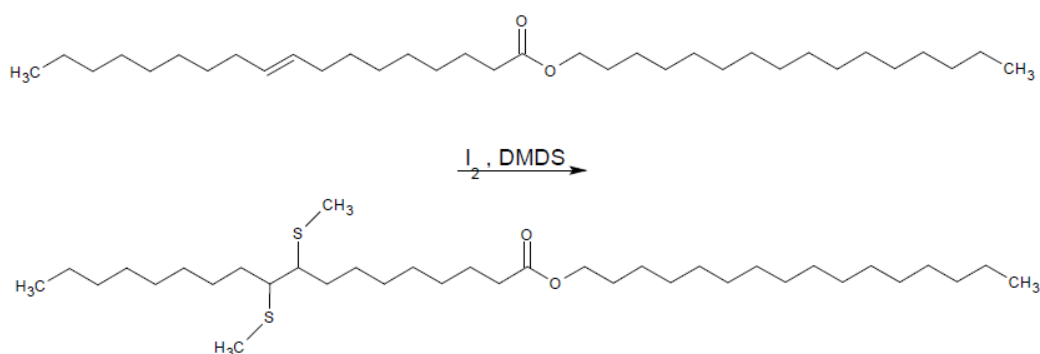
2.3.2 Dimethyldisulfidová derivatizace

K určení polohy dvojné vazby je možné využít i dimethyldisulfidové (DMDS) derivatizace. Dimethyldisulfidových aduktů bylo využito k určení polohy dvojné vazby

již na počátku osmdesátých let minulého století [42]. Reakce s dimethyldisulfidem je jednoduchá a probíhá pouze v jediném kroku [43].

Doposud bylo využito DMDS derivatizace k určení polohy dvojné vazby u různých sloučenin jako např.: nevětvené alkeny, ethylestery dinenasycených mastných kyselin, voskové estery, mononenasycené mastné kyseliny, methylestery mononenasycených mastných kyselin a mononenasycené acetáty. Je tedy patrné, že tohoto druhu derivatizace je možno využít pro poměrně širokou škálu různých látek [27, 43-46].

DMDS derivatizace je reakce, která je katalyzována jódem (**obrázek 2**).

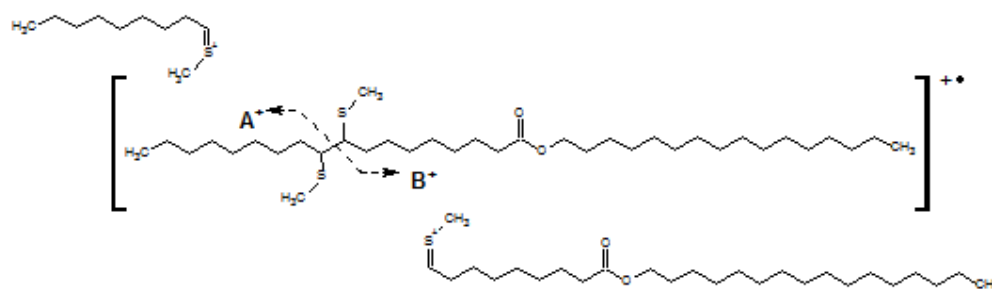


Obrázek 2

Schéma dimethyldisulfidové derivatizační reakce. Produktem reakce je nasycený derivát voskového esteru, kde jsou v místě původní dvojné vazby navázány methylsulfidové substituenty. Na obrázku je uveden příklad DMDS derivatizace pro palmityloléát.

Množství jódu potřebné ke katalýze se nezdá být kritickým, ačkoliv horší výsledky byly pozorovány při použití příliš malého či příliš velkého množství jódu. Podmínkou reakce je, aby probíhala bez přístupu světla [43]. Teplota pro tuto reakci je variabilní, platí, že s rostoucí teplotou se snižuje doba nutná k proběhnutí reakce. Lze je dokumentovat těmito příklady. Lze použít běžné laboratorní teploty, potom je třeba nechat reakční směs třepat 24 hodin [43]. Bylo publikováno i použití zvýšené teploty, kdy byla reakce prováděna s použitím teploty 40 °C a reakce probíhala přes noc, nebo také bylo použito teploty 50 °C a reakce probíhala 48 hodin [42,46]. Použito bylo i teploty 80 °C s reakčním časem 2 hodiny, v tomto případě ale výsledný produkt obsahoval i produkty, které obsahovaly pouze jednu methylthio skupinu [46].

Po derivatizační reakci lze určit polohu dvojné vazby pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) [27, 43-46]. Ve výsledných spektrech s použitím elektronové ionizace o energii 70 eV lze snadno rozpoznat molekulární ion a klíčové fragmenty, které jasně určují polohu dvojné vazby. Tyto klíčové fragmenty jsou nejintenzivnějšími signály ve spektru a vznikají štěpením vazby mezi uhlíky, na kterých jsou vázány methylsulfidové substituenty (**obrázek 3**) [48].



Obrázek 3

Schéma vzniku diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Struktura iontů odpovídá štěpení vazby mezi uhlíky s methylsulfidovými substituenty.

Hmotnostní spektra pro *E* a *Z* isomery jsou prakticky totožná, ovšem jejich rozlišení poskytují rozdílné retenční časy z plynové chromatografie [42].

DMDS derivatizaci lze využít i u sloučenin obsahujících dvě nebo tři dvojné vazby. Pokud je mezi dvojnými vazbami 4 a více uhlíků, pak derivatizace probíhá obdobně jako v případě sloučenin s jednou dvojnou vazbou a dochází ke štěpení vazeb mezi methylsulfidem substituovanými uhlíky, lze tedy určit polohu dvojných vazeb. Polohu dvojných vazeb lze určit i v případech, kdy jsou mezi dvojnými vazbami 1 až 3 uhlíky včetně. V těchto případech dochází k tvorbě 4, 5 a 6 čtených cyklických thioetherů, které jsou štěpeny v těsné blízkosti cyklu [26,47].

2.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

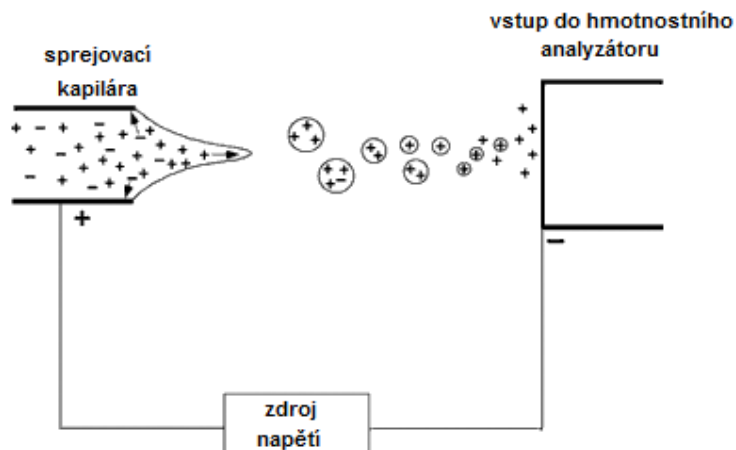
Základním principem hmotnostní spektrometrie je tvorba iontů z anorganických či organických sloučenin, separace těchto iontů na základě poměru jejich hmotnosti k

náboji (m/z) a detekce relativních intenzit jednotlivých iontů [48]. Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vakuový systém [49].

V hmotnostní spektrometrii se využívá různých ionizačních technik. Tyto techniky můžeme rozdělit obecně do dvou skupin, na měkké a tvrdé ionizační techniky, podle množství dodané energie. Dalším kritériem pro třídění ionizačních technik může být skupenství, ve kterém se látka před ionizací nachází, z tohoto kritéria vychází i případné spojení hmotnostního spektrometru se separačními technikami [49]. Pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je nejčastěji využívána elektronová ionizace patřící mezi tvrdé ionizační techniky a běžně je také využívána chemická ionizace patřící mezi měkké ionizační techniky. U spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je nejčastěji využívanou ionizační technikou ionizace elektrosprejem, další běžně využívanou technikou je chemická ionizace za atmosférického tlaku [48,49].

V této diplomové práci byly pro analýzu DMDS derivátů voskových esterů využity dva způsoby ionizace, a to ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku.

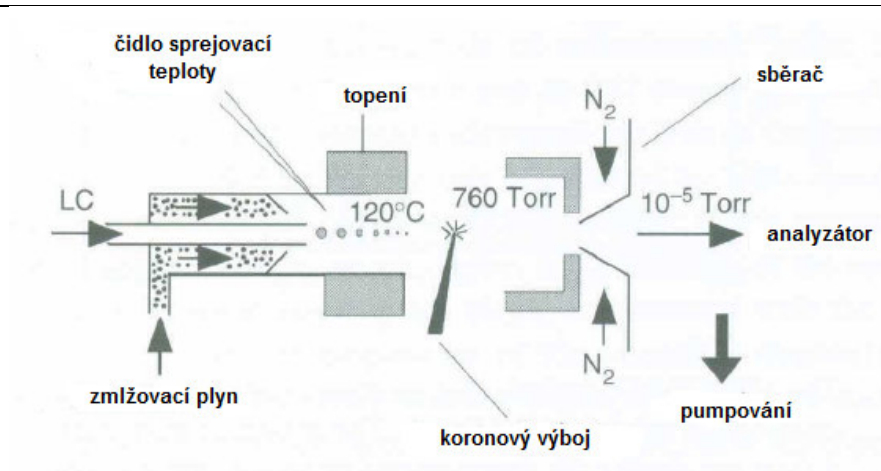
Při elektrosprejové ionizaci analyt prochází elektricky vodivou kapilárou, na kterou je vloženo kladné či záporné napětí, většinou 3-4 kV. Na konci kapiláry je pak analyt vystaven nehomogennímu elektrickému poli o velikosti okolo 10^6 Vm^{-1} . V procesu elektrosprejování vznikají velmi drobné kapičky kapalné fáze s vysokou hustotou povrchového náboje. Ty jsou protiproudem horkého inertního plynu (nejčastěji dusík) rychle vysušeny a ionty analytu přecházejí mechanismem iontového vypařování přímo do plynné fáze [3,48-50]. Schéma ionizace vyjadřuje **obrázek 4**.



Obrázek 4

Schéma principu ionizace elektrosprejem v kladném módu [3].

Chemické ionizace za atmosférického tlaku je využíváno především pro analýzu látek polárních a relativně nepolárních. Při tomto druhu ionizace je analyt přiváděn do pneumatického rozprašovače, jehož plášť je vyhříván na velmi vysokou teplotu, a tak dochází k odpaření mobilní fáze a vzorku. V prostoru koronového výboje generovaného na hrotu koronové jehly dochází především k ionizaci par mobilní fáze nebo molekul zmlžovacího plynu a tvorbě chemicko-ionizačního plazmatu. Molekuly analytu jsou pak ionizovány mechanismem stejným jako u chemické ionizace, pouze vše probíhá za atmosférického tlaku. Tento mechanismus dává vzniknout molekulárním aduktům typu $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ [49, 51]. Schéma APCI ionizace je zobrazeno na **obrázku 5**.



Obrázek 5

Schéma APCI zdroje [51].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

Aceton	p.a., Penta (Chrudim, ČR)
Acetonitril	Chromasolv [®] pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Benzen	p.a., Lachema (Brno, ČR)
Diethylether	p.a., Penta (Chrudim, ČR)
Dimethyldisulfid	≥99 % Merck (Darmstadt, Německo)
Elaidylalkohol	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Hexan	Suprasolv, Merck (Darmstadt, Německo)
Hydrogenuhlíčitan sodný	p.a., Lachema (Brno, ČR)
Chloroform	p.a., stabilizovaný 1 % ethylalkoholu, Penta (Chrudim, ČR)
Jod	p.a, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Kyselina elaidová	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Kyselina palmitová	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Kyselina petroselinová	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Kyselina sírová	96%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Kyselina vakcenová	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Methanol	Chromasolv, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
Octan amonný	>99%, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
Octan sodný	p.a., Lachema (Brno, ČR)
Palmitylalkohol	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Palmityleát	>99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Petroselinylalkohol	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)
Propan-2-ol	LiChrosolv, Merck (Darmstadt, Německo)
Rhodamin 6G	≥ 99 % Merck (Darmstadt, Německo)
Síran hořečnatý	>98%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Thionylchlorid	>99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Thiosíran sodný	Purum, Lachema (Brno, ČR)
Triethylamin	≥ 99 %, Merck (Darmstadt, Německo)
Uhličitan lithný	p.a., Lachema (Brno, ČR)
Vakcenyalkohol	>99%, Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)

3.2 POUŽITÝ MATERIÁL

Silikagel pro kolonovou chromatografii a filtrace	– velikost částic: 30-60 μm, aktivace 25 hodin při 120 °C, deaktivace 12 % vody, Merck (Darmstadt, Německo)
Silikagel pro TLC	– Silikagel 60G, Merck (Darmstadt, Německo)
Extrahovaná vata	– Soxhletova extrakce 10 hodin směsí chloroform:methanol (1:1, v/v)
Vyžíhaný síran hořečnatý	– 12 hodin při 140 °C

3.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ

3.3.1 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem

Pro analýzu voskových esterů a DMDS derivátů voskových esterů byl použit plynový chromatograf Agilent 6890N spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975B s iontovým zdrojem pro elektronovou ionizaci a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (Agilent Technologies, USA), vybavený kapilární kolonou DB-1ms (model J&W 122-0132 Agilent Technologies, USA) o délce 30 m se stacionární fází 100% dimethylpolysiloxanem s vnitřním průměrem 250 μm a tloušťkou filmu

0,25 μm . Jako nosný plyn bylo používáno helium. Vzorky byly nastříkovány pomocí automatického dávkovače Agilent 7683B (Agilent Technologies, USA). Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program ChemStation (Agilent Technologies, USA).

3.3.1.1 Podmínky GC/MS analýz

▪ Metoda pro voskové estery

Při GC/MS analýze byl použit dělicí poměr 50:1 a byl dávkován 1 μl vzorku. V použitém teplotním programu byla počáteční teplota pece 60 $^{\circ}\text{C}$, tato teplota byla udržována po dobu dvou minut, poté byla zvyšována rychlostí 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teplotu 320 $^{\circ}\text{C}$. Teplota 320 $^{\circ}\text{C}$ byla udržována dalších 10 minut. Doba analýzy byla 38,0 minut.

▪ Metoda pro derivatizované voskové estery

Při GC/MS analýze byl použit dělicí poměr 30:1 a byly dávkovány 3 μl vzorku. V použitém teplotním programu byla počáteční teplota pece 70 $^{\circ}\text{C}$, tato teplota byla udržována po dobu jedné minuty, poté byla zvyšována rychlostí 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teplotu 240 $^{\circ}\text{C}$. Z teploty 240 $^{\circ}\text{C}$ na 320 $^{\circ}\text{C}$ se teplota zvyšovala rychlostí 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Teplota 320 $^{\circ}\text{C}$ byla udržována dalších 15 minut. Doba analýzy byla 35,4 minut.

3.3.2 Hmotnostní spektrometr

Pro měření MS a MS/MS spekter dimethyldisulfidových derivátů bylo použito hybridního hmotnostního spektrometru Q-TOF microTM (Waters, USA) kombinujícího kvadrupólový analyzátor a průletový analyzátor. Ionizace bylo dosaženo pomocí elektrospreje nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku. Pro sběr dat a vyhodnocení hmotnostních spekter byl použit program MassLynxTM (Waters, USA).

3.3.3 Další přístroje

Gradientové čerpadlo	SpectraSYSTEM P4000 Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA)
Třepačka	Schoeller IKA® KS 130 Basic (Staufen, Německo)
Analytické váhy	Mettler-Toledo AB204-S (Greifensee, Švýcarsko)

3.4 METODIKA MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

3.4.1 Příprava standardů voskových esterů

Výchozími látkami pro syntézu byly mastné kyseliny a alkoholy. Příslušná kyselina (6,0 mg) byla v Erlenmayerově baňce rozpuštěna v thionylchloridu (100 μ l). Směs byla třepána při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Poté byl přidán benzen (400 μ l) a směs byla odpařena dosucha. Do další Erlenmayerovy baňky byl navážen alkohol (6,0 mg) a byl rozpuštěn v chloroformu (200 μ l). Roztok alkoholu byl přidán do Erlenmayerovy baňky s rozpuštěnou kyselinou a ještě byl přidán triethylamin (100 μ l). Po 60 minutách při laboratorní teplotě bylo přidáno pár kapek 5% roztoku kyseliny sírové. Dále byla přidána voda (2,0 ml) a diethylether (3,5 ml). Směs byla protřepána a organická fáze byla uchována. Vodná fáze byla protřepána s diethyletherem (2 x 3 ml). Organické extrakty byly spojeny a protřepány s vodou (2 x 2,0 ml). Výsledný organický extrakt byl vysušen pomocí MgSO_4 , přefiltrován přes extrahovanou vatu a odpařen dosucha. Vzorky byly uskladněny v mrazáku.

3.4.2 Tenkovrstevná chromatografie

3.4.2.1 Analytická tenkovrstevná chromatografie

Pro analytickou tenkovrstevnou chromatografii (TLC) byly použity skleněné destičky (36 x 76 mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck) a 12 % sádry. Byl nanesen standard voskového esteru a vzorek. Pro vyvinutí destičky byla použita mobilní fáze hexan:ether (93:7, v/v). Desky byly vyvíjeny ve skleněné vaně do výšky asi 0,5 cm pod horní okraj desky. Po vysušení byly skvrny vizualizovány sprejováním koncentrovanou

kyselinou sírovou a následným zahřátím horkovzdušnou pistolí.

3.4.2.2 Preparativní tenkovrstevná chromatografie

Pro preparativní TLC byly použity stejné destičky jako u analytické TLC. Destičky byly před použitím předmyty směsí chloroform:methanol (2:1, v/v). Vzorky byly naředěny chloroformem na koncentraci 2 mg/ml. Vzorky ze syntézy standardů voskových esterů byly nanášeny na desky pomocí skleněných kapilár. Pro vyvíjení byla použita mobilní fáze hexan:ether (93:7, v/v). Desky byly vyvíjeny ve skleněné vaně do výšky asi 0,5 cm pod horní okraj desky. Po vysušení desek byla provedena vizualizace pomocí roztoku Rhodaminu 6G (5% roztok v ethanolu) a osvětlením pomocí UV lampy (254 nm). Příslušná zóna voskových esterů byla z destičky seškrábnuta do skleněné kolonky (vnitřní průměr 7 mm) s extrahovanou vatou převrstvenou asi 1 cm vysokým sloupcem silikagelu a vymývána diethyletherem. Vzniklý roztok byl odpařen do sucha a vzorky byly rozpuštěny v chloroformu (2 mg/ml).

3.4.3 Měření čistoty standardů voskových esterů

Čistota voskových esterů byla měřena pomocí GC/MS. Zjištění hodnoty čistoty standardů bylo provedeno porovnáním zjištěných ploch píků v chromatogramech.

3.4.4 Optimalizace DMDS derivatizační reakce

Optimalizace dimethyldisulfidové derivatizační reakce byla prováděna za účelem dosažení co nejkratšího času reakce s co možná největším výtěžkem reakce. Výchozí byl následující postup. Jako výchozí látka byl použit 1 mg standardu voskového esteru (palmityloléát) ve skleněné vialce s teflonovým víčkem. K naváženému standardu bylo přidáno 0,2 ml dimethyldisulfidu a 0,05 ml roztoku jódu v diethyletheru (60 mg/ml). Poté byla směs promíchána a vialka obalena alobalem, aby reakce probíhala bez přístupu světla. Reakce probíhala za laboratorní teploty a za stálého třepání a během reakce byly odebírány vzorky (50 µl) v časových intervalech 0,5 h; 1,5 h; 3 h a 5 h. Po uplynutí reakčního času byla reakce ukončena přidáním 0,5 ml hexanu a odbarvením směsi přidavkem několika kapek vodného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5%). Poté byla odsáta

vodná fáze a směs byla vysušena přidáním MgSO_4 . Konečným krokem byla filtrace přes vat. Takto upravený vzorek byl analyzován pomocí GC/MS.

Při dalším pokusu bylo použito opět stejného standardu jako výchozí látky a stejného výše uvedeného derivatizačního postupu pouze s tím rozdílem, že reakce probíhala při 70°C na vodní lázni s reakčním časem 0,5 h a objem derivatizovaného vzorku byl 250 μl . Vyhodnocení bylo provedeno opět pomocí GC/MS analýzy.

Z výsledných chromatogramů byl odhadnut výtěžek reakce, a to provnáním ploch píků výchozí látky a produktu derivatizační reakce.

3.4.5 GC/MS měření DMDS derivátů voskových esterů

Všechny připravené standardy voskových esterů byly zderivatizovány postupem uvedeným v kapitole 3.4.4 str. 27, přičemž reakce probíhala 0,5 h při teplotě 70°C na vodní lázni. Produkty reakce byly analyzovány pomocí GC/MS.

3.4.6 Měření MS/MS spekter DMDS derivátů voskových esterů s použitím APCI a ESI ionizace

Měření fragmentačních hmotnostních spekter (MS/MS spekter) bylo prováděno pomocí hybridního hmotnostního spektrometru Q-TOF micro (kapitola 3.3.2 str. 25). Cílem optimalizace bylo zjistit, zda protonované molekuly ($[\text{M}+\text{H}]^+$) či adukty s alkalickými kovy ($[\text{M}+\text{Li}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$) a s amonným iontem ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$) poskytují v MS/MS spektrech ionty umožňující určit polohu dvojné vazby v původním voskovém esteru. Pro jednotlivé adukty byly optimalizovány MS parametry, zejména kolizní energie a napětí na kóně, parametry měření jsou uvedeny v **tabulce 1** a **2**. Následným vyhodnocením naměřených MS/MS spekter byl zvolen optimální iontový zdroj a adukty pro měření MS/MS spekter DMDS derivátů voskových esterů. Ze zderivatizovaného vzorku bylo odpařeno rozpouštědlo, po odpaření byl vzorek rozpuštěn v dané mobilní fázi (kapitoly 3.4.6.1 a 3.4.6.2, str. 29). Hmotnostní spektrometr byl průběžně kalibrován pomocí vhodných kalibrantů.

Tabulka 1

Nastavení hmotnostního spektrometru Q-TOF micro™ s APCI pro měření DMDS derivátů voskových esterů.

Proud na jehlové elektrodě [μA]	4
Napětí na vzorkovacím kónusu [V]	20
Teplota sondy [°C]	400
Teplota zdroje [°C]	150
Průtok desolvatačního plynu [L/hod]	450
Průtok plynu ve vzorkovacím kónusu [L/hod]	50
Kolizní energie v kvadrupólu [eV]	26

Tabulka 2

Nastavení hmotnostního spektrometru Q-TOF micro™s ESI pro měření DMDS derivátů voskových esterů.

Napětí na sprejovací kapiláře [V]	3500
Napětí na vzorkovacím kónusu [V]	30
Teplota zdroje [°C]	100
Teplota desolvatačního plynu [°C]	100
Průtok desolvatačního plynu [L/hod]	250
Průtok plynu ve vzorkovacím kónusu [L/hod]	50
Kolizní energie v kvadrupólu [eV]	30

3.4.6.1 Měření s použitím APCI ionizace

Byla použita mobilní fáze o složení propan-2-ol:acetonitril (2:1, v/v), ta byla přiváděna gradientovým čerpadlem při průtoku 0,5 ml/min.

3.4.6.2 Měření s použitím ESI ionizace

Byla použita mobilní fáze se složením 95% methanol a 5 % voda (v/v), ta byla přiváděna gradientovým čerpadlem při průtoku 0,1 ml/min. Bylo testováno několik kationizačních činidel, jednalo se o roztoky (100 mmol/l) těchto solí: CH₃COONa, CH₃COOK, CH₃COONH₄, Li₂CO₃. Tyto soli byly rozpuštěny v mobilní fázi a přidávány k analyzovanému vzorku přibližně v poměru 1:3.

3.4.7 Měření MS/MS spekter standardu alkenů

Standard alkenů *cis*-9-trikosen byl derivatizován postupem uvedeným v kapitole 3.4.4 str. 27, přičemž reakce probíhala 0,5 h při teplotě 70°C na vodní lázni. Rozpouštědlo bylo odpařeno a vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi propan-2-ol:acetonitril (2:1, v/v). Při měření byla mobilní fáze propan-2-ol:acetonitril (2:1, v/v) přiváděna pomocí pumpy s použitím průtoku 0,5 ml/min. Vzorek byl měřen na hmotnostním spektrometru Q-TOF micro™ s APCI za podmínek uvedených v **tabulce 3**.

Tabulka 3

Nastavení hmotnostního spektrometru Q-TOF micro™ s APCI pro měření alkenů *cis*-9-trikosenu.

Proud na jehlové elektrodě [μA]	3,5
Napětí na vzorkovacím kónusu [V]	20
Teplota sondy [°C]	400
Teplota zdroje [°C]	100
Průtok desolvatačního plynu [L/hod]	450
Průtok plynu ve vzorkovacím kónusu [L/hod]	50
Kolizní energie v kvadrupólu [eV]	18

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

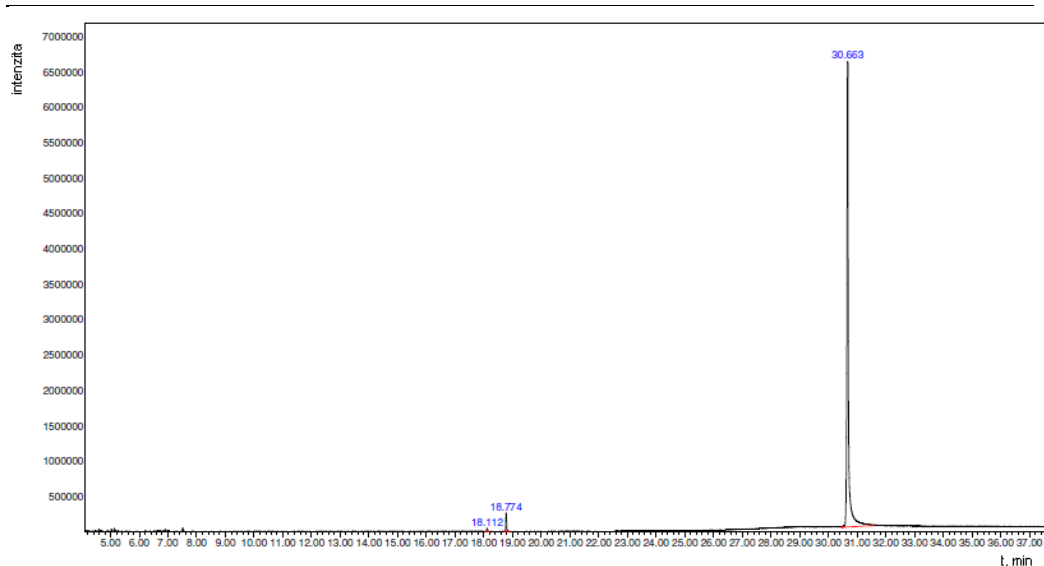
4.1 SYNTÉZA VOSKOVÝCH ESTERŮ

Po provedení esterifikační reakce a izolace pomocí TLC byly získány vzorky voskových esterů, které jsou uvedeny v **tabulce 4**. Pomocí GC/MS analýzy byla ověřena čistota těchto vzorků. Odhad procentuálního zastoupení voskových esterů ve vzorku byl proveden porovnáním ploch píků příslušných voskových esterů a celkové plochy všech píků v příslušných chromatogramech. Příklad chromatogramu je zobrazen na **obrázku 6**. Pík voskových esterů eluoval vždy v 30. minutě analýzy, jeho identifikace byla provedena pomocí hmotnostního spektra. Z hmotnostních spekter byly identifikovány i vedlejší produkty syntézy, kterými byly methylestery a ethylestery příslušných mastných kyselin. Píky těchto vedlejších produktů měly retenční časy mezi 18. a 20. minutou.

Tabulka 4

Syntetizované voskové estery a jejich čistota.

16:0-18:1n-7	> 99%
18:1n-7-16:0	> 94%
16:0-18:1n-9	> 99%
18:1n-9-16:0	> 99%
16:0-18:1n-9 <i>trans</i>	> 95%
18:1n-9 <i>trans</i> -16:0	> 98%
16:0-18:1n-12	> 98%
18:1n-12-16:0	> 99%

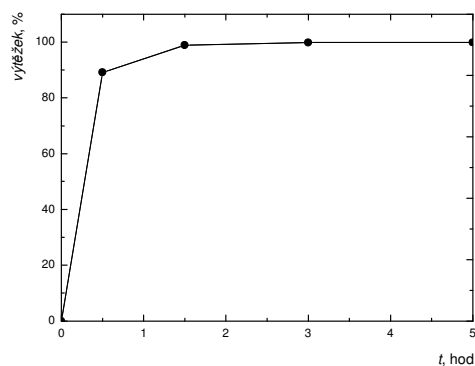


Obrázek 6

GC/MS chromatogram produktů syntézy voskového esteru 18:1n-9 *trans*-16:0. Píky v 18. minutě odpovídají methylesteru kyseliny palmitové a ethylesteru kyseliny palmitové. Pík v 30. minutě odpovídá voskovému esteru 18:1n-9 *trans*-16:0.

4.2 OPTIMALIZACE DERIVATIZAČNÍ REAKCE

Cílem optimalizace bylo dosažení co nejkratšího času reakce zároveň s dosažením co největšího výtěžku. Nejprve byla DMDS derivatizační reakce prováděna za laboratorní teploty a stálého třepání, přičemž byla sledována závislost výtěžku reakce na času reakce. Tuto závislost vyjadřuje graf na **obrázku 7**.

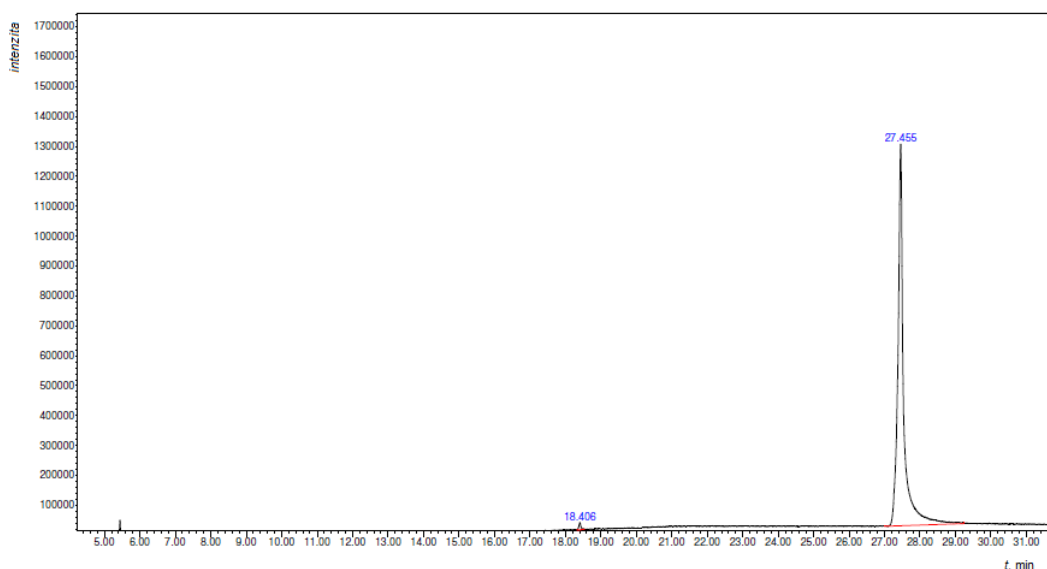


Obrázek 7

Graf závislosti výtěžku DMDS derivatizační reakce na čase reakce.

Ukázalo se, že hranice 99% výtěžku je při těchto podmínkách dosaženo až po 3 hodinách.

V závislosti na dosažených výsledcích a ve snaze o urychlení reakce byla navržena změna podmínek. Místo laboratorní teploty bylo použito 70 °C vodní lázně a času reakce 0,5 h, stálé třepání již nebylo použito. Z výsledného chromatogramu byl podle ploch píků odhadnut výtěžek reakce. Výtěžek reakce byl více než 99,3 % (**obrázek 8**). Jako optimální byly zvoleny tyto podmínky a byly použity při všech dalších experimentech.



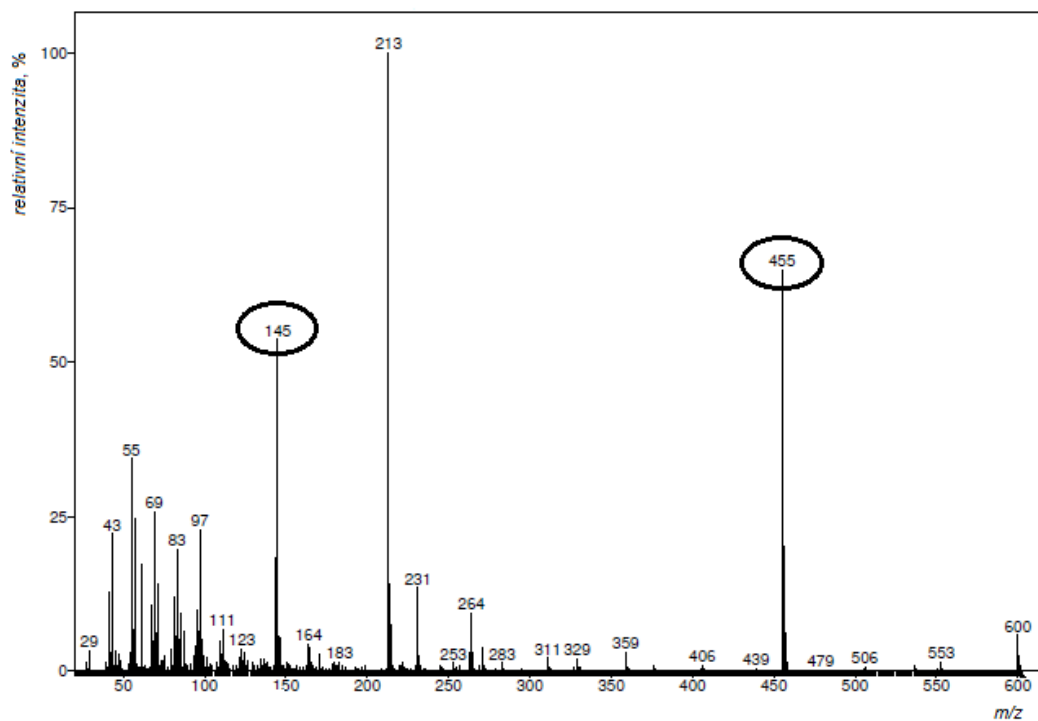
Obrázek 8

GC/MS chromatogram produktů derivatizace voskového esteru 16:0-18:1n-9 pomocí DMDS. Pík v 18. minutě odpovídá výchozímu voskovému esteru. Pík v 27. minutě odpovídá DMDS derivátu výchozího voskového esteru.

4.3 GC/MS MĚŘENÍ DMDS DERIVÁTŮ VOSKOVÝCH ESTERŮ

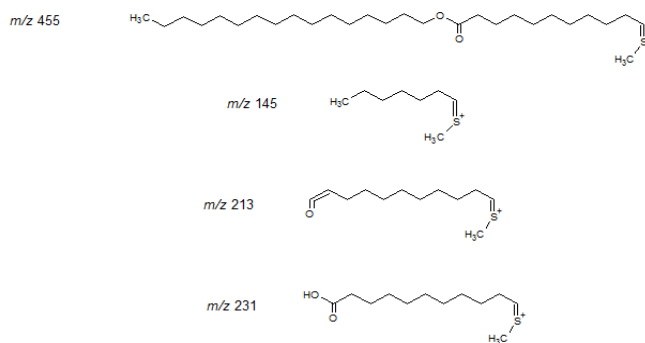
Pomocí GC/MS analýzy byla změřena EI hmotnostní spektra DMDS derivátů voskových esterů, aby mohla být použita pro srovnání s ESI a APCI hmotnostními spektry DMDS derivátů voskových esterů. Na **obrázku 9** je zobrazeno EI hmotnostní spektrum odpovídající DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-7. Nejintenzivnější píky ve spektru odpovídají fragmentům vzniklým štěpením vazby mezi uhlíky

substituovanými methylsulfidem, pomocí kterých lze určit polohu dvojné vazby. Další intenzivní píky odpovídají iontům vzniklým štěpením v okolí esterové vazby, nebo v okolí esterové vazby a zároveň v místě vazby methylthiosubstituovaných uhlíků (obrázek 10).



Obrázky 9

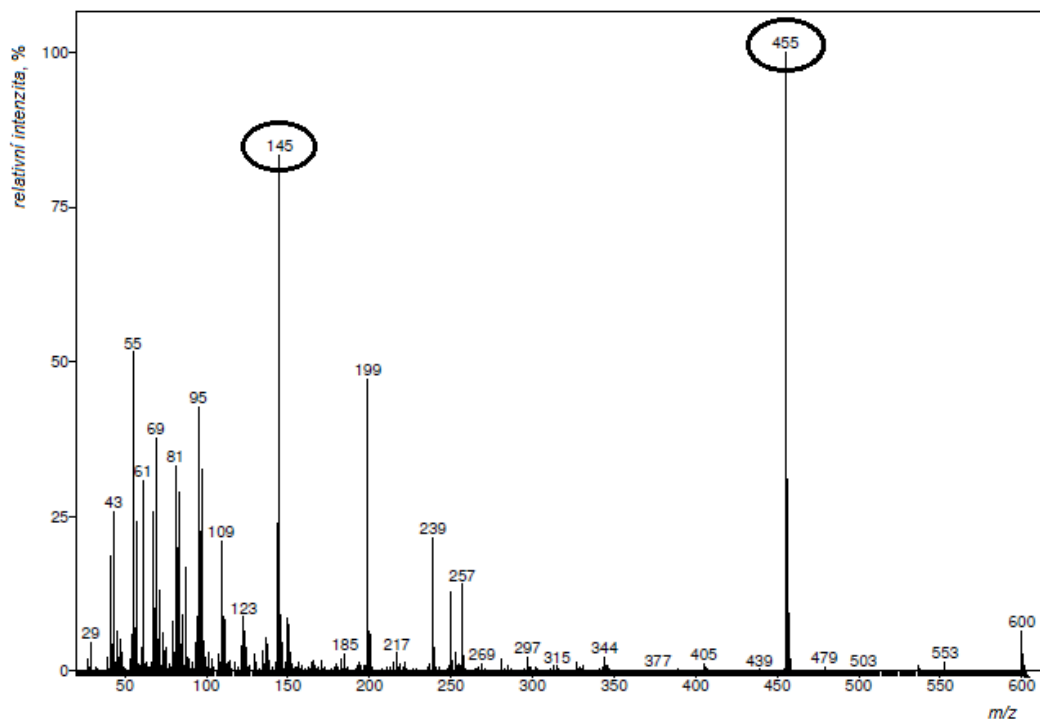
El hmotnostní spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-7. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby.



Obrázky 10

Pravděpodobná struktura nejintenzivnějších iontů v EI hmotnostním spektru DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-7.

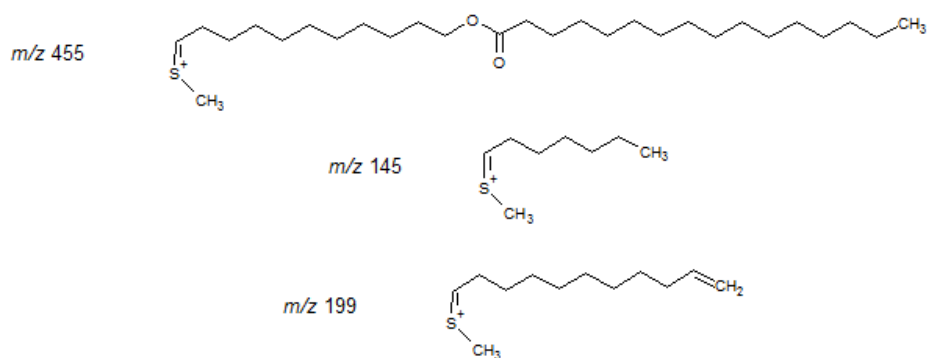
Na **obrázku 11** je zobrazeno EI hmotnostní spektrum odpovídající DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-7-16:0.



Obrázek 11

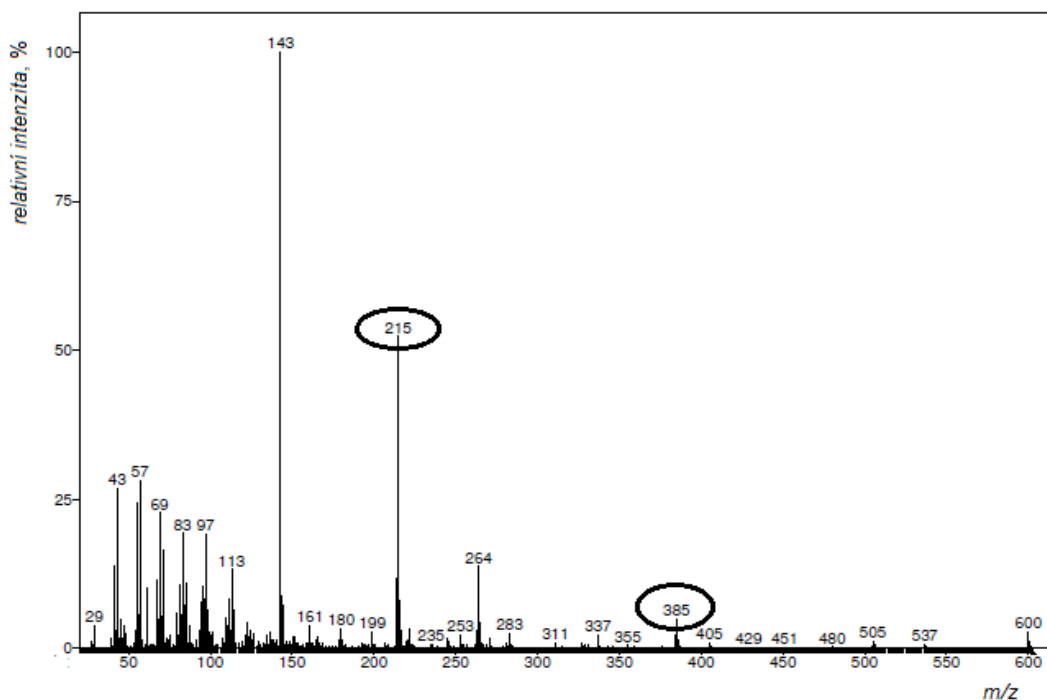
EI hmotnostní spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-7-16:0. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby.

Nejintenzivnější píky ve spektru odpovídají fragmentům vzniklým štěpením vazby mezi uhlíky substituovanými methylsulfidem, pomocí kterých lze určit polohu dvojné vazby. Další intenzivní píky odpovídají iontům vzniklým štěpením v okolí esterové vazby a zároveň v místě vazby methylsubstituovaných uhlíků, nebo jen štěpením v okolí esterové vazby. Pravděpodobná struktura iontů odpovídajících nejintenzivnějším píčkům ve spektru je vyjádřena na **obrázku 12**.

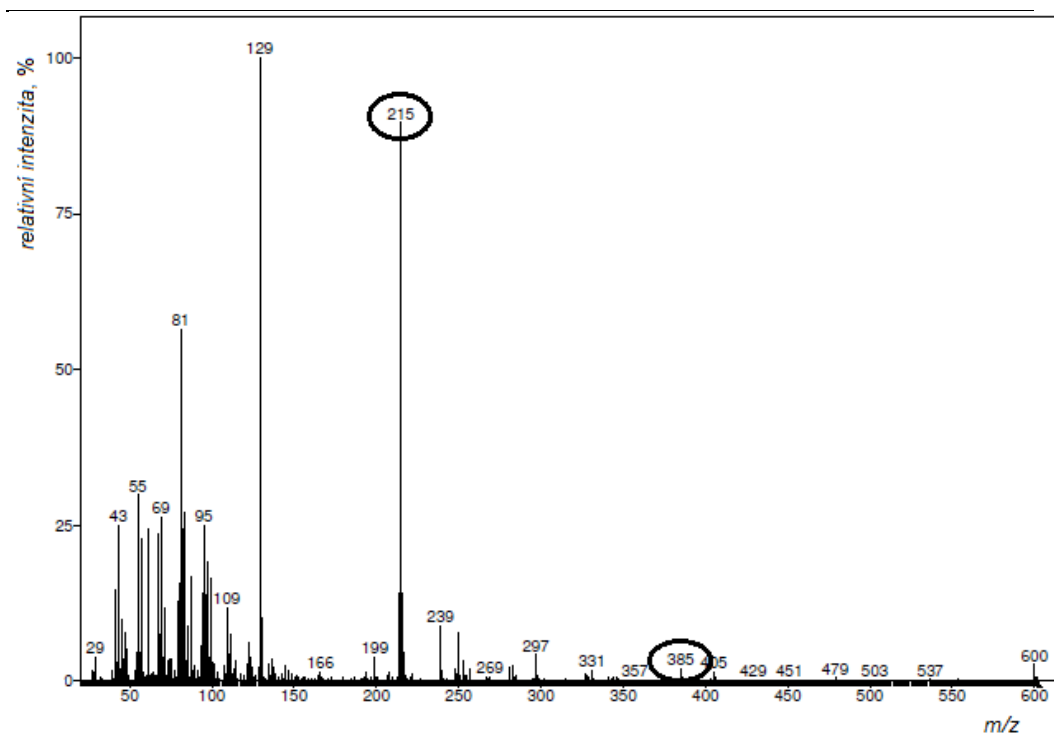
**Obrázek 12**

Pravděpodobná struktura nejintenzivnějších iontů v EI hmotnostním spektru DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-7-16:0.

V případě DMDS derivátů voskových esterů 16:0-18:1n-12 a 18:1n-12-16:0 lze pozorovat podstatně menší intenzitu iontů určujících polohu dvojné vazby (**obrázek 13** a **14**).

**Obrázek 13**

EI spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-12. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby.



Obrázek 14

EI spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-12-16:0. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby.

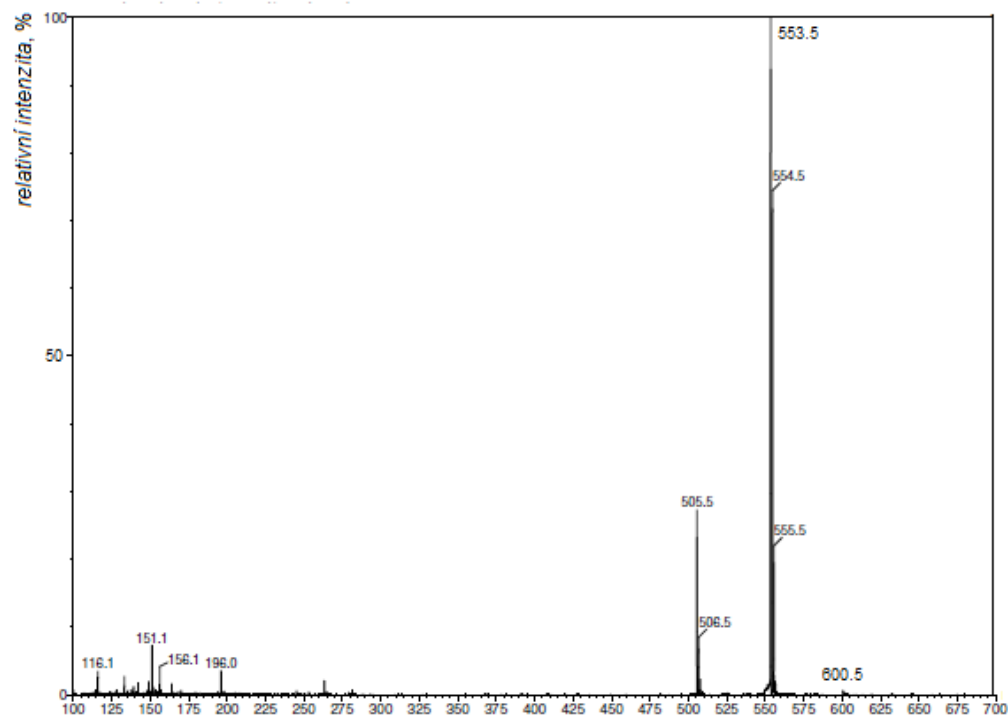
Intenzita je velmi nízká především u iontu s m/z 385, jehož součástí je esterová vazba. Lze se domnívat, že tento jev je způsoben blízkostí dvojné vazby k esterové vazbě, kdy pravděpodobně dochází ke snadnému odštěpení methylsulfidu jako neutrální částice a zmizí tak místo, kde by se molekula štěpila.

4.4 MS/MS MĚŘENÍ DMDS DERIVÁTŮ VOSKOVÝCH ESTERŮ

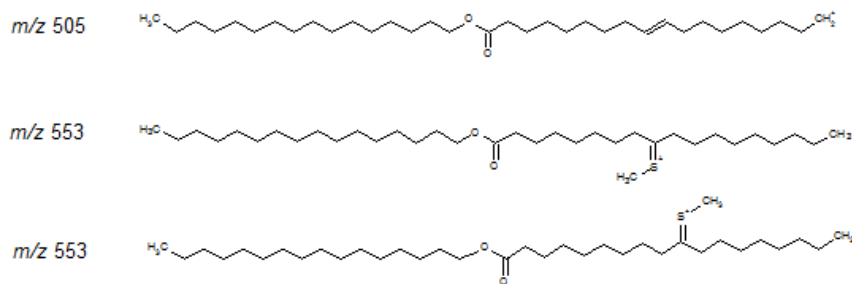
4.4.1 Optimalizace nastavení iontových zdrojů

4.4.1.1 Optimalizace nastavení APCI zdroje

V MS spektru DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9 s použitím kolizní energie 5 eV byly identifikovány dva velmi intenzivní ionty (**obrázek 15**). Tyto ionty odpovídají molekule derivátu se ztrátou jedné methylsulfidové skupiny

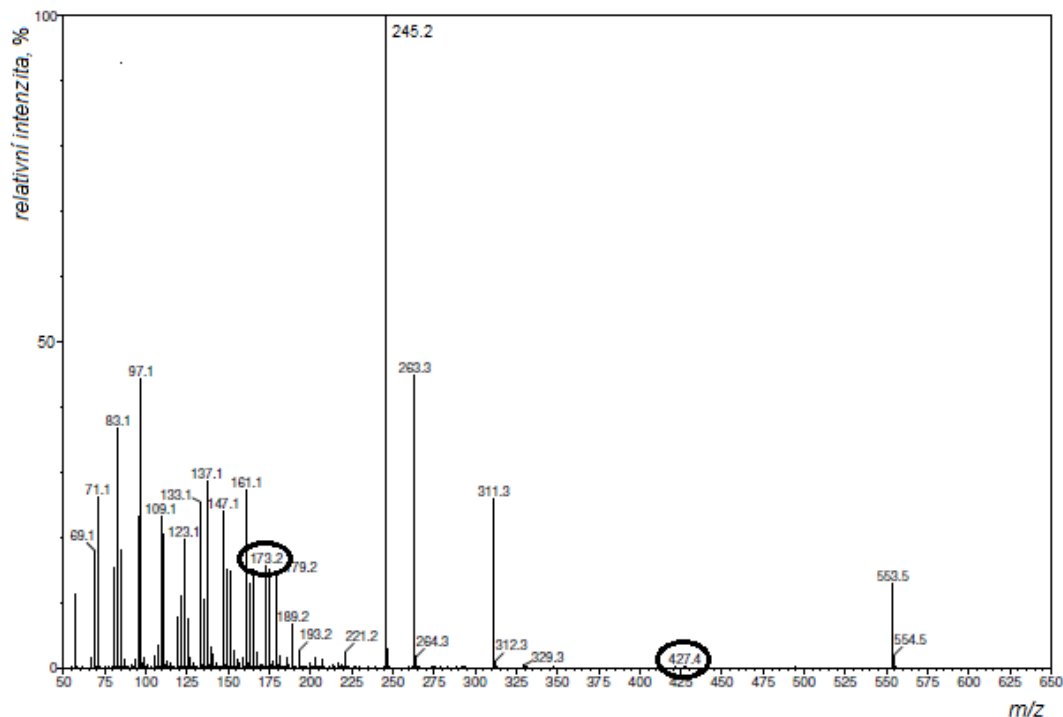


APCI MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9 s použitím kolizní energie 5 eV.



Pravděpodobná struktura iontů s nejintenzivnějším signálem v APCI MS spektru DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9.

Iont s m/z 553 byl podroben fragmentačním pokusům, při kterých se ukázalo, že v MS/MS spektrech je možné identifikovat diagnostické ionty polohy dvojné vazby. Pro fragmentaci iontu s m/z 553 bylo zoptimalizováno nastavení APCI zdroje. MS/MS spektrum tohoto iontu s nejintenzivnějšími signály diagnostických iontů bylo dosaženo za těchto podmínek: napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV (**obrázek 17**). Stejné podmínky pak byly použity pro APCI MS/MS měření DMDS derivátů všech voskových esterů.

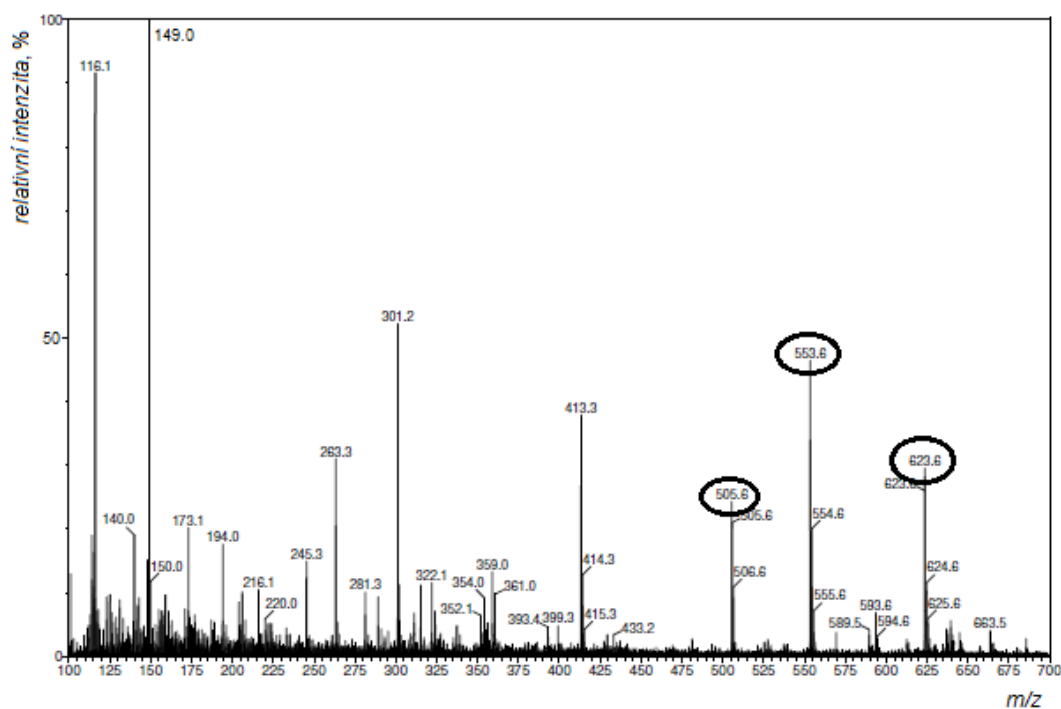


Obrázek 17

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Kolizní energie 26 V, napětí na vzorkovacím kónusu 20 eV.

4.4.1.2 Optimalizace nastavení ESI zdroje

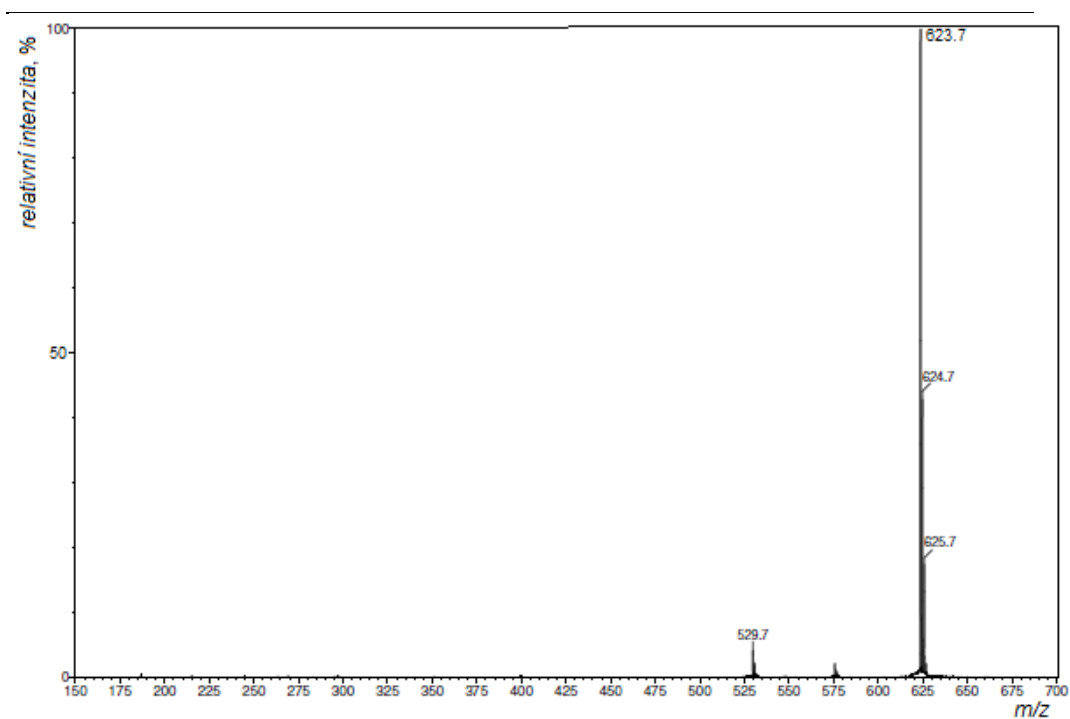
V ESI MS spektru (napětí na vzorkovacím kónusu 40 V, kolizní energie 5 eV) DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9 byly opět identifikovány signály odpovídající iontu molekuly po ztrátě jedné methylsulfidové skupiny (m/z 553) i obou methylsulfidových skupin (m/z 505) (**obrázek 18**). Ve spektru byl i poměrně intenzivní signál odpovídající aduktu molekuly derivátu se sodíkem ($[M+Na]^+$, m/z 623).



Obrázek 18

ESI MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Napětí na vzorkovacím kónusu 40 V, kolizní energie 5 eV.

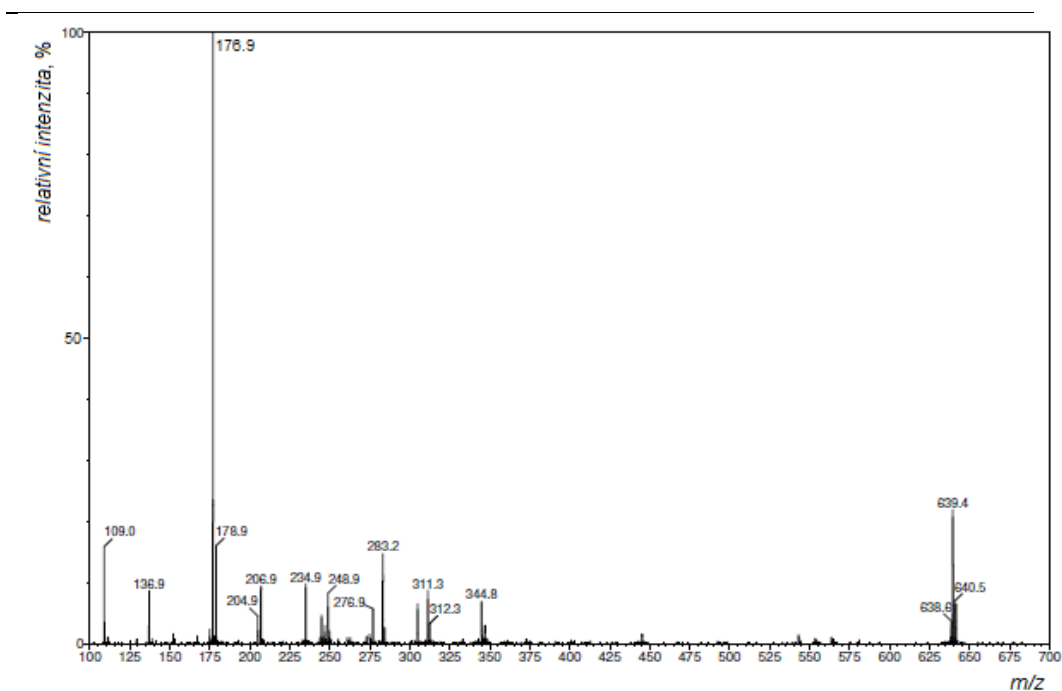
Výsledkem fragmentace iontu s m/z 553 bylo spektrum s identickými ionty jako v případě měření APCI MS/MS (kapitola 4.4.1.1, str. 37). Byly provedeny fragmentační pokusy u sodíkového aduktu s m/z 623, ale ani s použitím velké fragmentační energie nebylo dosaženo fragmentace, která by mohla sloužit k určení polohy dvojné vazby (**obrázek 19**).



Obrázek 19

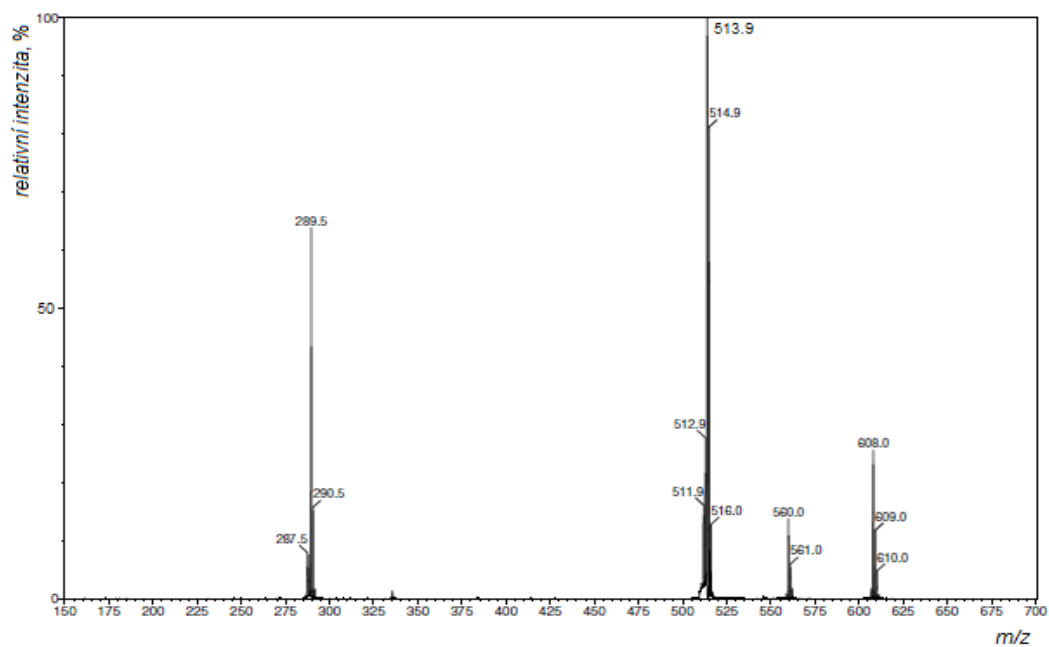
ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Prekurzorový ion m/z 623. Napětí na vzorkovacím kónusu 40 V, kolizní energie 35 eV.

Dále byla testována kationizační činidla. S použitím draselné soli vznikl adukt molekuly derivátu s draslíkem ($[M+K]^+$, m/z 639). V příslušném MS/MS spektru však nebyly nalezeny signály iontů, které by mohly určit polohu dvojné vazby (**obrázek 20**). Ani v případě použití lithné soli se z molekulárního aduktu ($[M+Li]^+$, m/z 607) nepodařilo získat fragmentační spektrum, které by mohlo být použito k určení polohy dvojné vazby (**obrázek 21**).



Obrázek 20

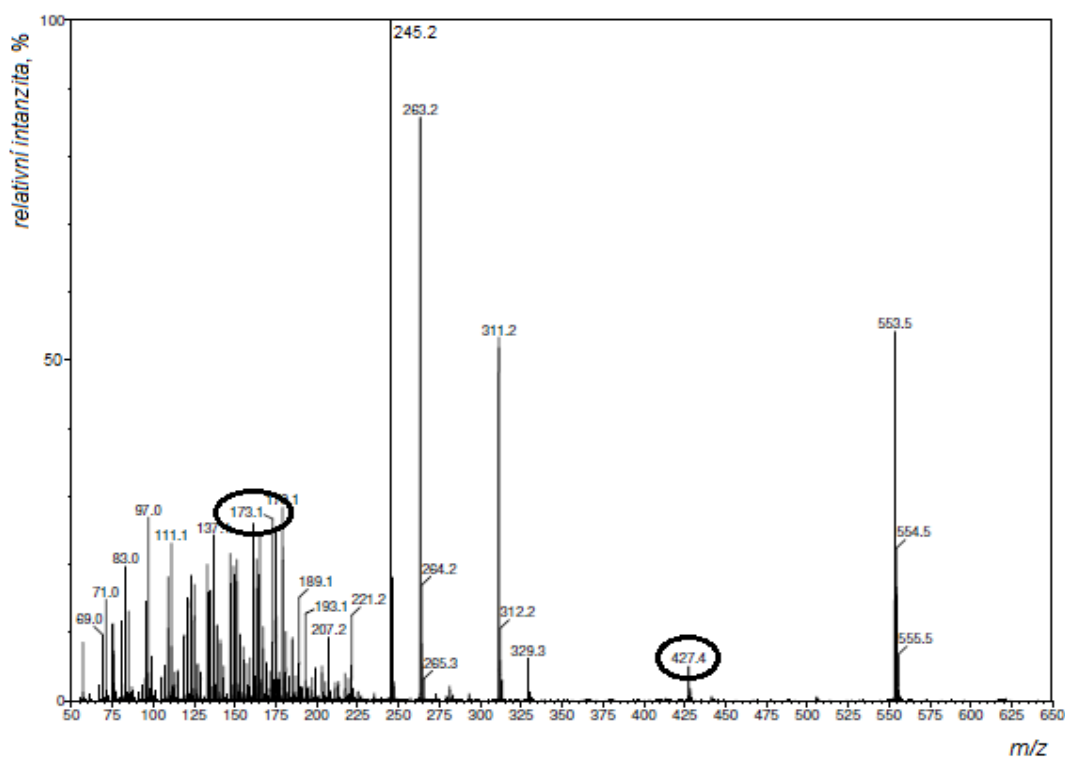
ESI MS/MS spektrum draslíkového aduktu DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Prekurzorový ion m/z 639. Napětí na vzorkovacím kónusu 40 V, kolizní energie 26 eV.



Obrázek 21

ESI MS/MS spektrum lithného aduktu DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Prekurzorový ion m/z 608. Napětí na vzorkovacím kónusu 40 V, kolizní energie 32 eV.

Při použití amonné soli docházelo k tvorbě amonného aduktu s molekulou DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9 ($[M+NH_4]^+$, m/z 618). Fragmentací tohoto iontu bylo změřeno MS/MS spektrum, které umožňuje určení polohy dvojné vazby (**obrázek 22**). V tomto spektru lze nalézt signály totožných iontů jako v případě APCI MS/MS spektra s fragmentací iontu s m/z 553, rozdílem je pouze jejich relativní intenzita. Je pravděpodobné, že při fragmentaci iontu s m/z 618 se z aduktu odštěpí amoniak a jedna molekula methylthiolu a poté dochází k fragmentaci iontu s m/z 553, což by vysvětlovalo vznik totožných fragmentů. Pro měření amonných aduktů bylo vyladěno nastavení iontového zdroje. Jako nejlepší se ukázalo nastavení s napětím na vzorkovacím kónusu 30 V a s kolizní energií 30 eV. Toto nastavení pak bylo použito pro ESI MS/MS měření DMDS derivátů všech voskových esterů.

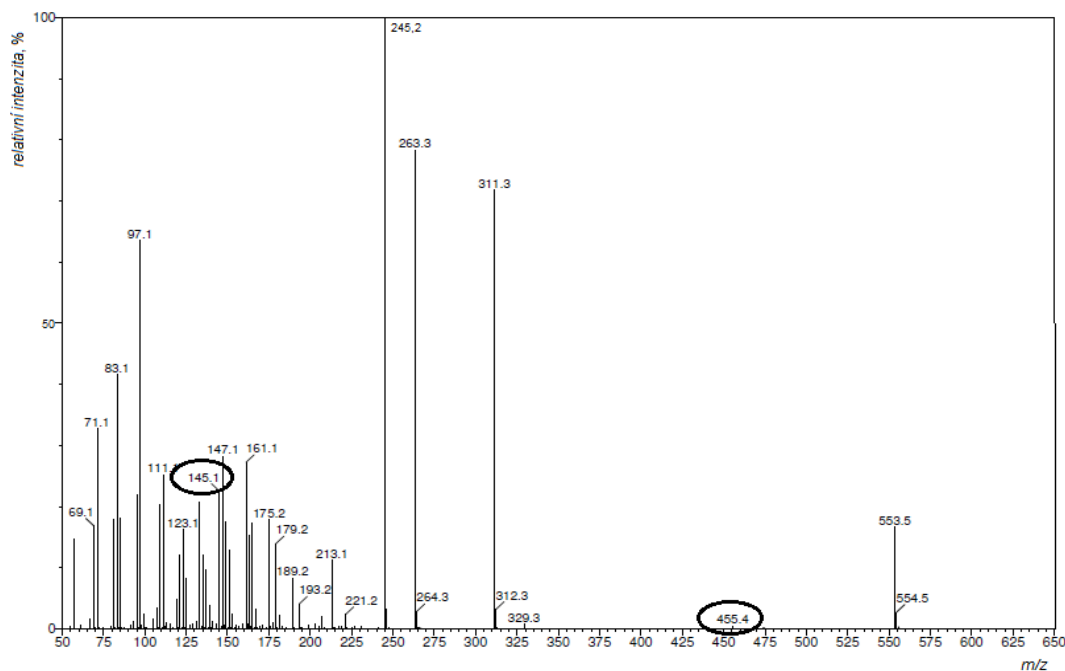


Obrázek 22

ESI MS/MS spektrum amonného aduktu DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Prekurzorový ion m/z 618. Jsou zvýrazněny signály odpovídající iontům určujícím polohu dvojné vazby. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.

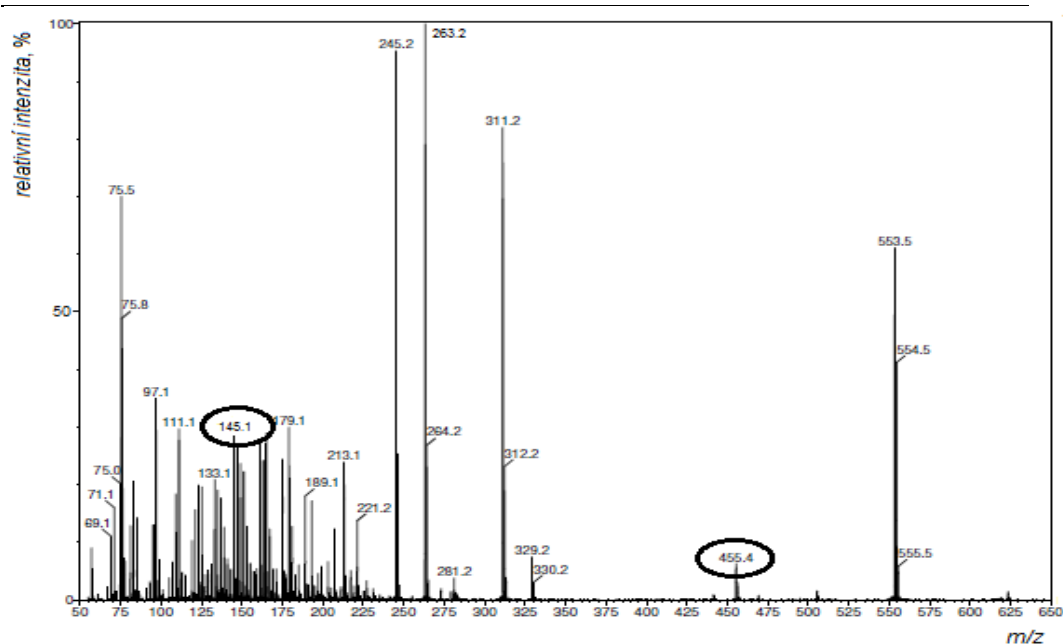
4.4.2 Měření MS/MS spekter DMDS derivátů voskových esterů při optimálních podmínkách

Byla změřena spektra DMDS derivátů všech připravených voskových esterů s APCI a ESI ionizací při použití zjištěných optimálních podmínek nastavení iontových zdrojů. Při měření APCI MS/MS spekter byl fragmentován ion s m/z 553. Pro fragmentaci bylo použito napětí na vzorkovacím kónusu 20 V a kolizní energie 26 eV. Při měření ESI MS/MS spekter byl fragmentován amonný adukt $([M+NH_4]^+)$, m/z 618). Pro fragmentaci bylo použito napětí na vzorkovacím kónusu 30 V a kolizní energie 30 eV. Fragmentační spektra DMDS derivátů voskových esterů při použití APCI i ESI ionizace obsahují signály odpovídající stejným iontům, spektra se ale odlišují intenzitou těchto iontů. Příklady fragmentačních spekter DMDS derivátů voskových esterů 16:0-18:1n-7 a 18:1n-7-16:0 jsou zobrazeny na **obrázcích 23 – 26**. Ve spektrech jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů dvojné vazby.



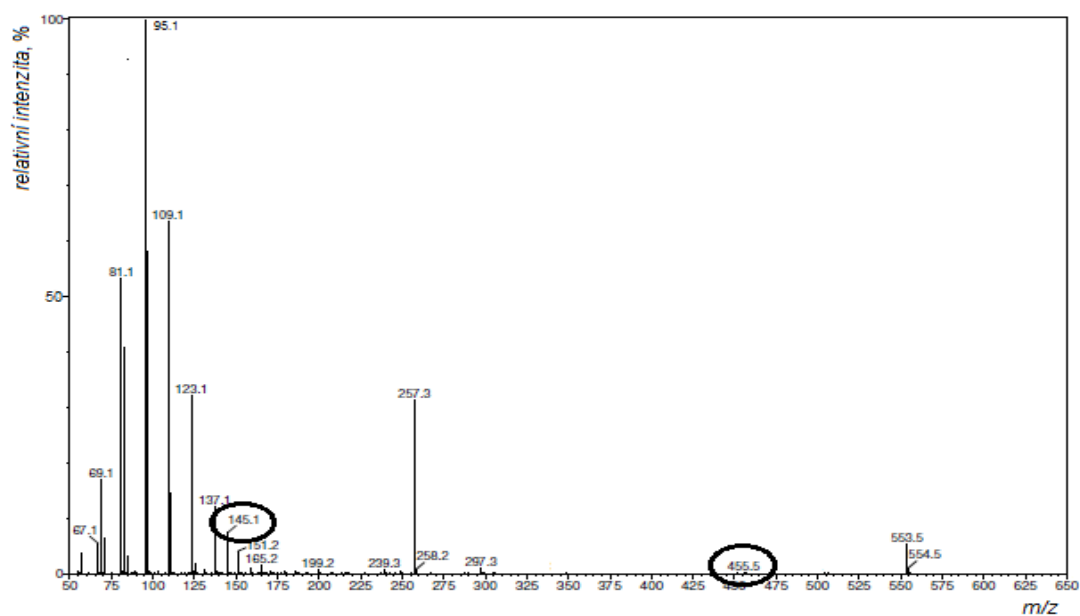
Obrázek 23

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-7. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



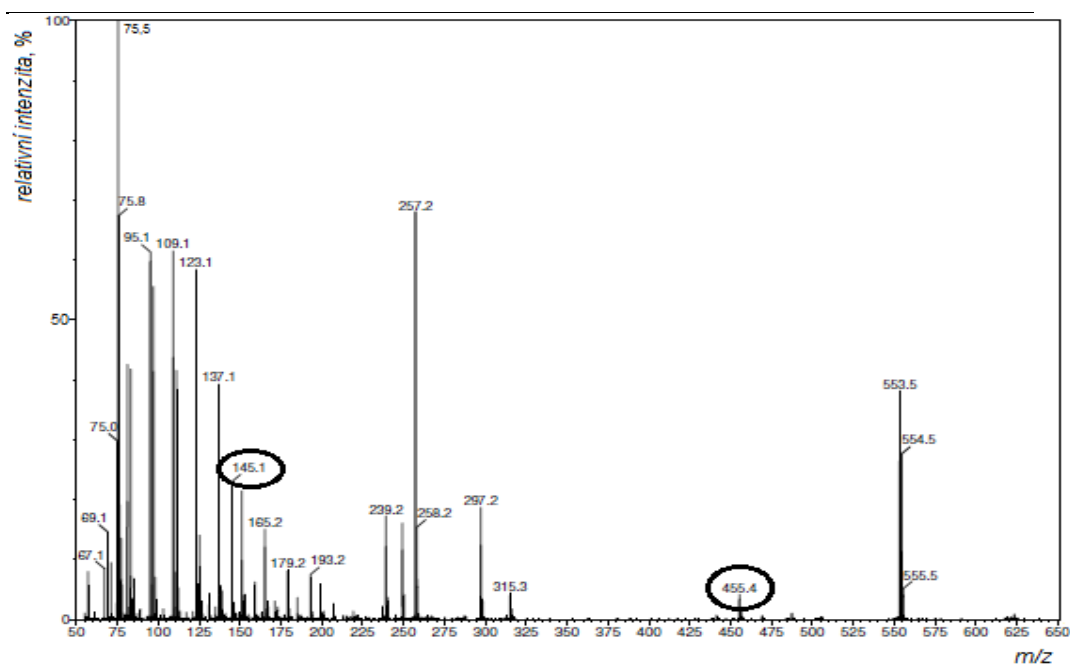
Obrázek 24

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-7. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.



Obrázek 25

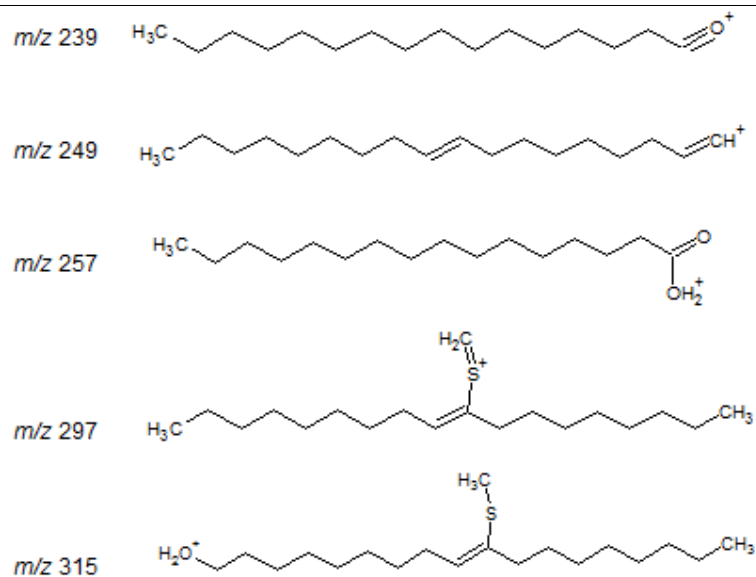
APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-7-16:0. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



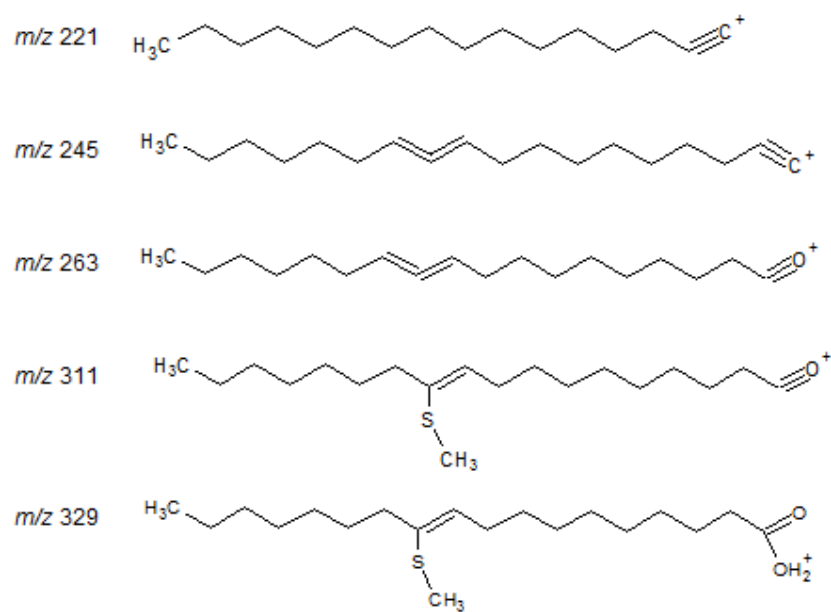
Obrázek 26

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-7-16:0. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.

Diagnostické ionty polohy dvojné vazby jsou společné všem výše zobrazeným spektrům (**obrázky 23-26**). U fragmentačních spekter DMDS derivátů voskových esterů s polohou dvojné vazby v alkoholové části esteru lze pozorovat další společné ionty (**obrázek 27**). To samé platí i pro deriváty s polohou dvojné vazby v kyselinové části (**obrázek 28**). Tyto společné ionty vznikají vlivem štěpení v okolí esterové vazby. Kromě fragmentů vznikajících štěpením v okolí esterové je dalším společným jevem přítomnost alifatických iontových sérií, které lze vyjádřit těmito obecnými vzorci: $C_nH_{2n-3}^+$ (m/z 67, 81, 95, 109, 123, 137...), $C_nH_{2n-1}^+$ (m/z 69, 83, 97, 111, 125, 139...), $C_nH_{2n+1}^+$ (m/z 71, 85, 99...).

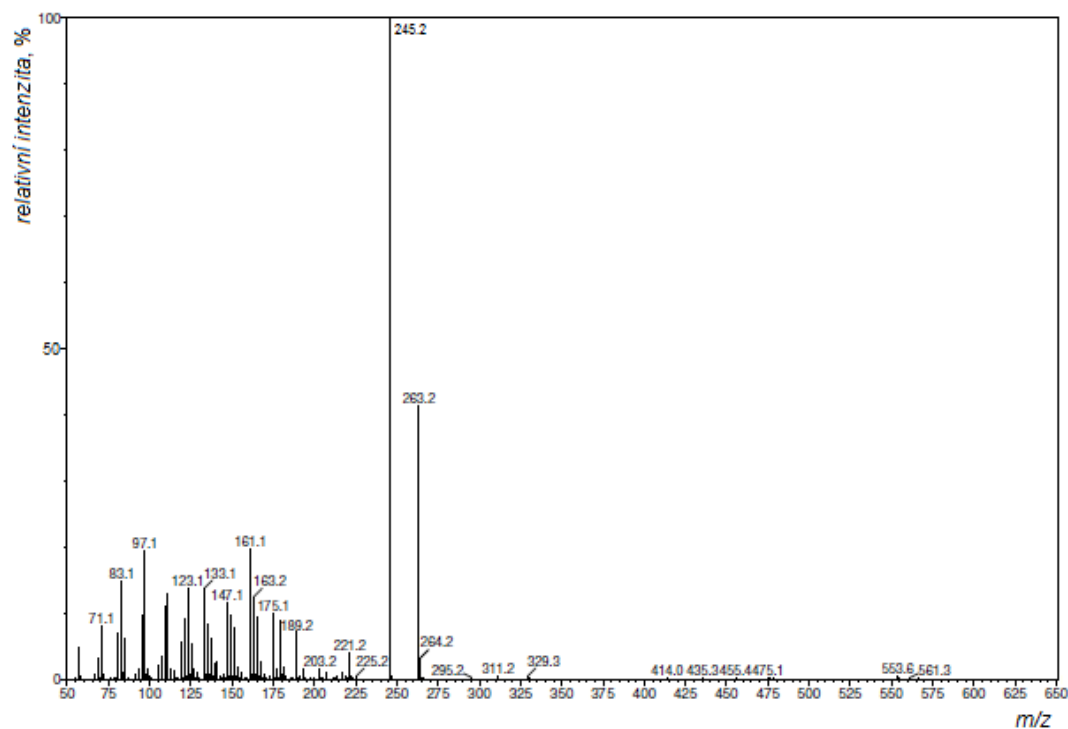
**Obrázek 27**

Pravděpodobná struktura iontů vznikajících při fragmentaci DMDS derivátů voskových esterů s dvojnou vazbou v kyselinové části.

**Obrázek 28**

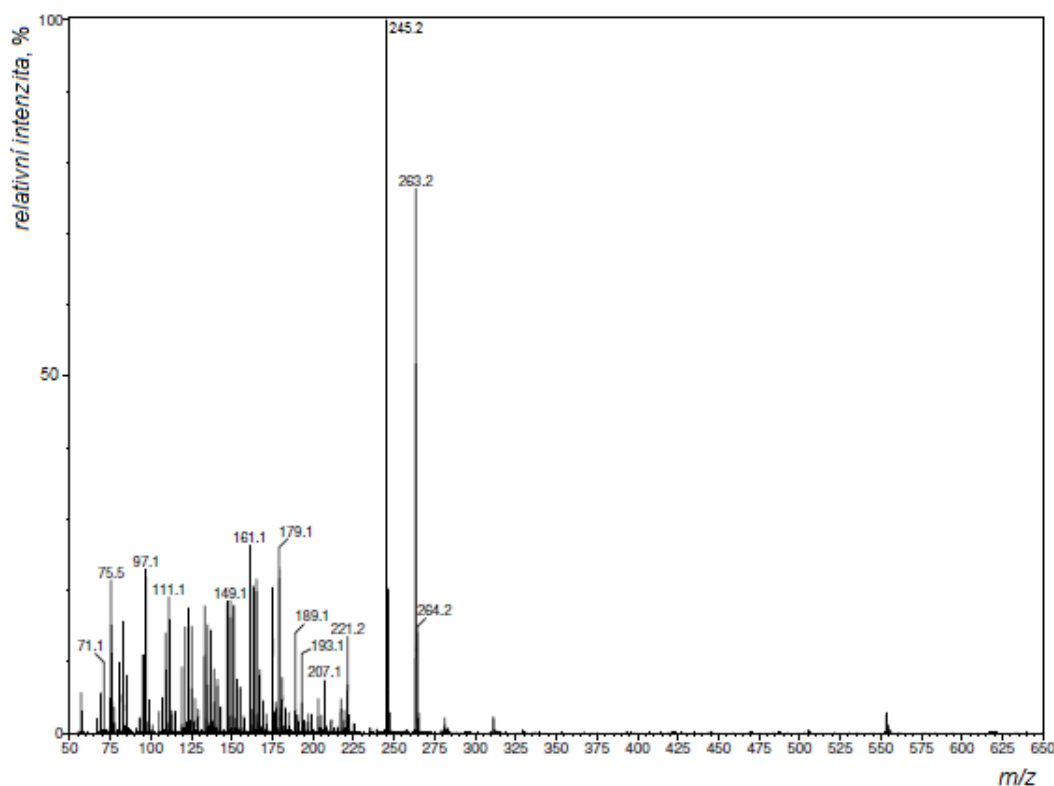
Pravděpodobná struktura iontů vznikajících při fragmentaci DMDS derivátů voskových esterů s dvojnou vazbou v alkoholové části.

Výjimku lze pozorovat v APCI a ESI MS/MS spektrech u DMDS derivátů voskových esterů 16:0-18:1n-12 a 18:1n-12-16:0. V případě derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-12 nelze v spektrech identifikovat ani jeden signál odpovídající jednomu ze dvou diagnostických iontů polohy dvojné vazby (**obrázky 29 a 30**).



Obrázek 29

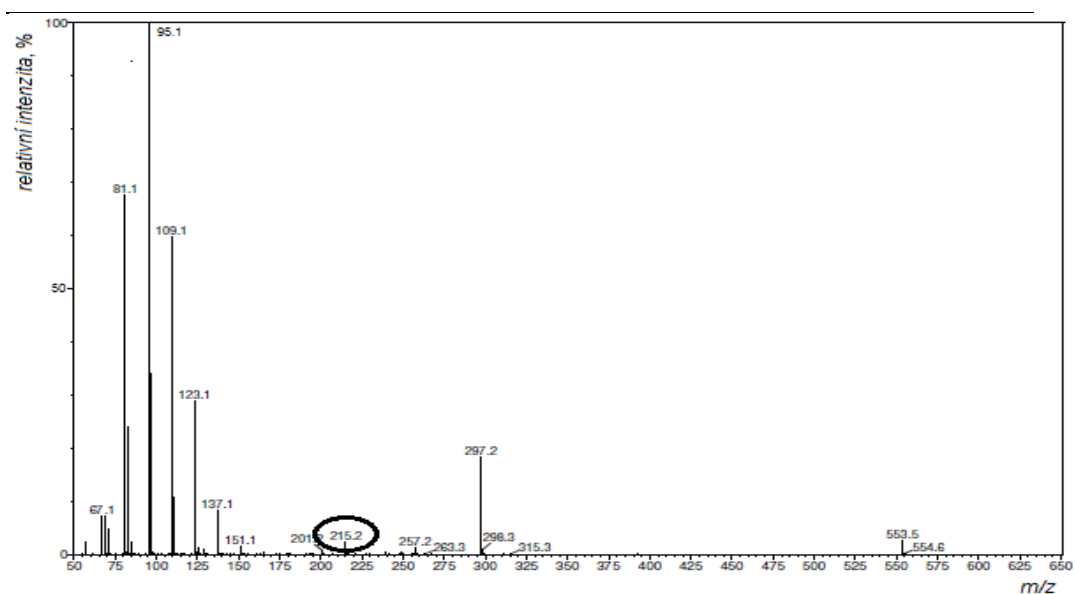
APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-12. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



Obrázek 30

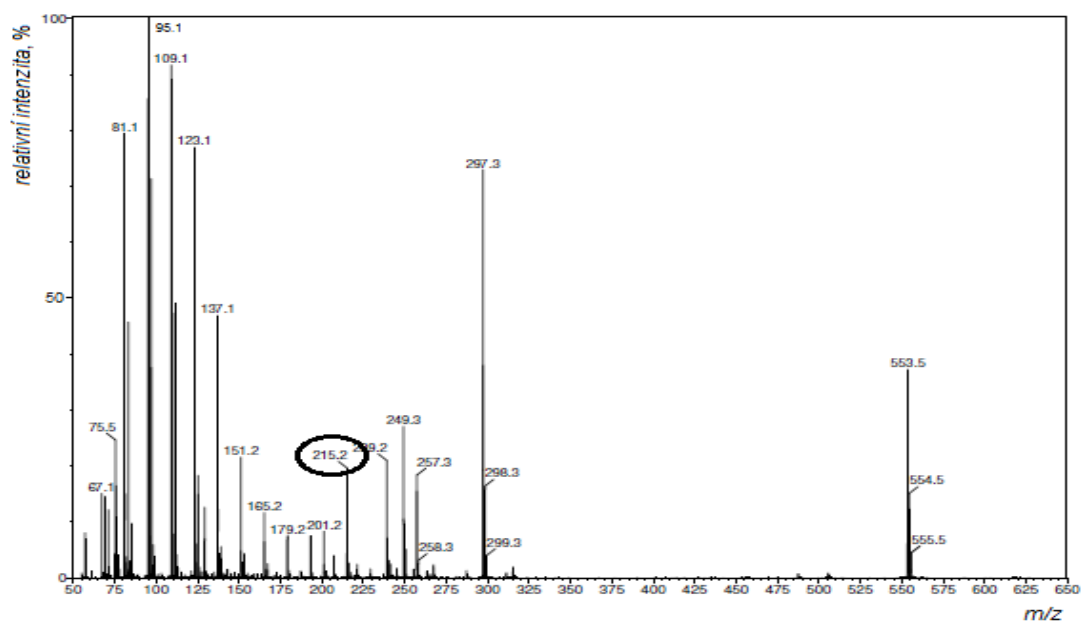
ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-12. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.

U derivátu voskového esteru 18:1n-12-16:0 je ve spektru pozorovatelný pouze signál odpovídající jednomu diagnostickému iontu polohy dvojné vazby, a to menšímu z diagnostické dvojice iontů bez esterové vazby (**obrázky 31 a 32**). Výjimka u derivátů těchto esterů byla pozorována i v případě EI spekter, ve kterých byla intenzita signálu diagnostických iontů podstatně menší ve srovnání s EI spektry ostatních derivátů voskových esterů. I v případě APCI a ESI spekter je pravděpodobnou příčinou blízkost dvojné vazby k esterové vazbě, kdy pravděpodobně dochází ke snadné eliminaci methylthiolu a zmizí tak místo, kde by se molekula štěpila.



Obrázek 31

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-12-16:0. Je zvýrazněn signál diagnostického iontu polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



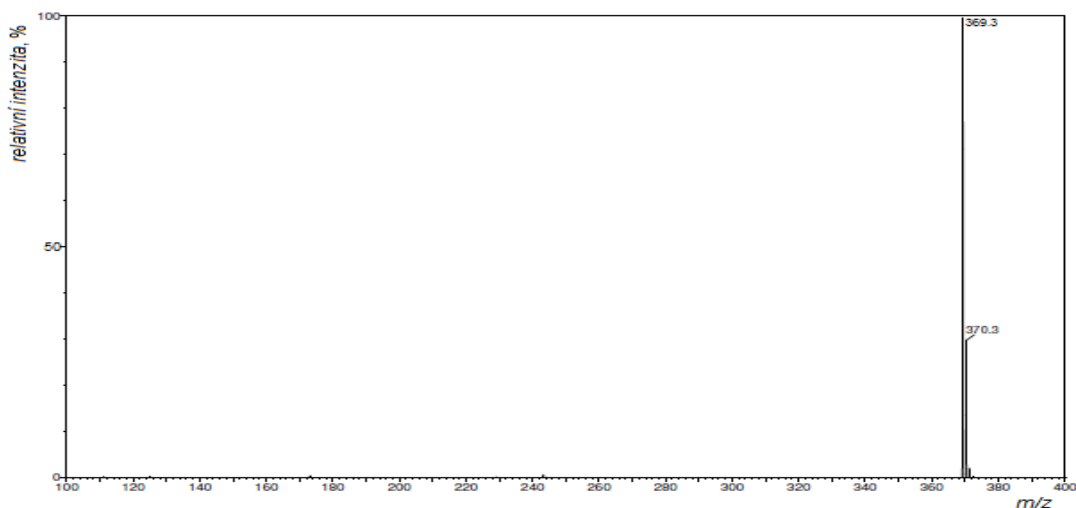
Obrázek 32

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-12-16:0. Je zvýrazněn signál diagnostického iontu polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.

APCI a ESI MS/MS spektra DMDS derivátů dalších voskových esterů jsou obsažena v **přílohách A až H**. Z naměřených výsledků vyplynulo, že by hmotnostní detekce s APCI a ESI ionizací mohla být využita pro identifikaci polohy dvojné vazby u voskových esterů s předcházející DMDS derivatizací. Ovšem při aplikaci této metody je nutné brát v úvahu, že detekce je omezena vzdáleností polohy dvojné vazby od esterové vazby. V případě že je tato vzdálenost malá, pak detekce polohy dvojné vazby není zcela jednoznačná a v některých případech je zcela nemožná.

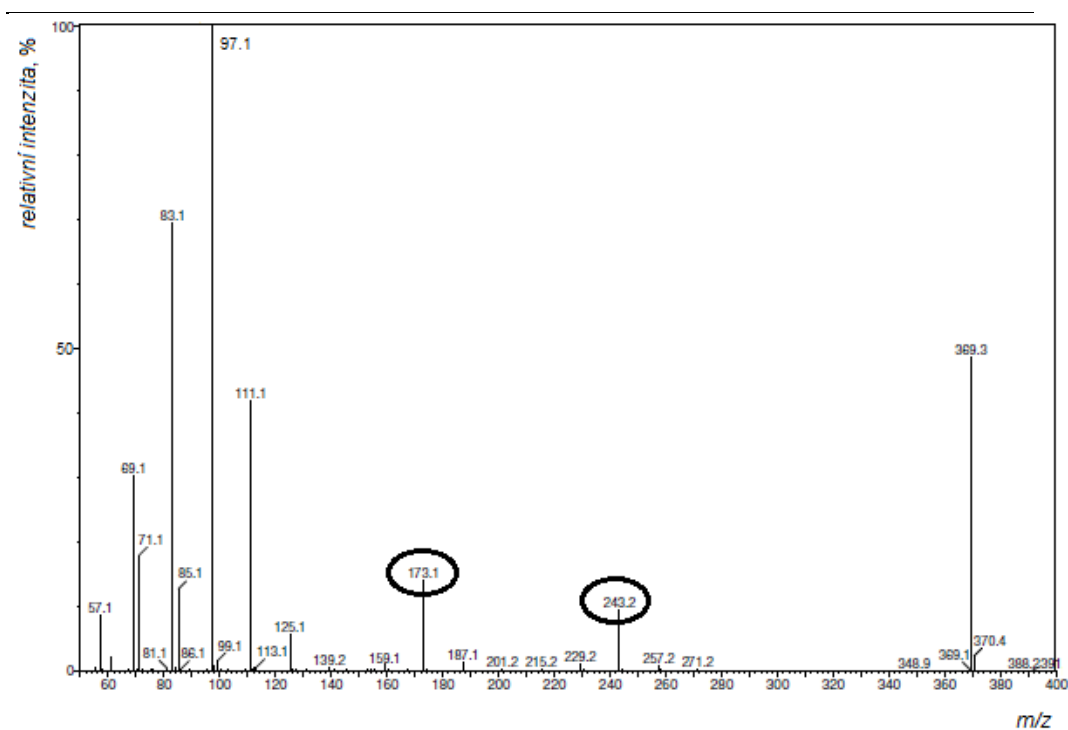
4.5 MS/MS MĚŘENÍ DMDS DERIVÁTU STANDARDU ALKENU

Analyzovaný DMDS derivát *cis*-9-trikosenu je látkou velmi nepolární, proto byl pro měření zvolen iontový zdroj typu APCI. V MS spektru nejintenzivnější signál odpovídal molekule *cis*-9-trikosenu substituovaného jedním methylsulfidem (**obrázek 33**). V získaném fragmentačním spektru lze snadno identifikovat ionty odpovídající štěpení vazby mezi uhlíky substituovanými methylsulfidem (**obrázek 34**). Pravděpodobná struktura diagnostických iontů polohy dvojné vazby je uvedena na **obrázku 35**. Lze tudíž vyvodit závěr, že metody DMDS derivatizace by ve spojení s APCI MS/MS detekcí bylo možné využít i pro určení polohy dvojné vazby u alkenů.



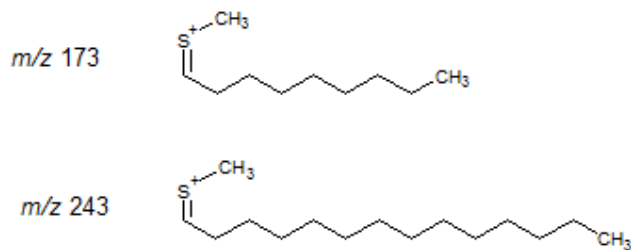
Obrázek 33

APCI MS spektrum DMDS derivátu *cis*-9-trikosenu. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie – 5 eV.



Obrázek 34

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu *cis*-9-trikosenu. Jsou zvýrazněny signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 369. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 18 eV.



Obrázek 35

Pravděpodobná struktura diagnostických iontů polohy dvojné vazby u DMDS derivátu *cis*-9-trikosenu.

5 ZÁVĚR

Podařilo se připravit osm voskových esterů, které se liší polohou dvojné vazby, její geometrií a polohou esterové vazby. Tyto estery byly použity v dalším průběhu práce.

V první fázi se podařilo zoptimalizovat podmínky derivatizační reakce. Díky zvýšení reakční teploty na 70 °C bylo dosaženo zkrácení doby trvání reakce na 0,5 h. Urychlení reakce je významné pro praktické využití derivatizační reakce.

Po zoptimalizování nastavení APCI a ESI iontových zdrojů bylo možno změřit fragmentační hmotnostní spektra DMDS derivátů všech připravených voskových esterů. Ve většině fragmentačních spekter byly identifikovány signály diagnostických iontů dvojné vazby. Tyto výsledky dávají možnost využití hmotnostní detekce s APCI a ESI ionizací pro určení polohy dvojné vazby. Jako omezující parametr se ukázala vzdálenost polohy dvojné vazby od esterové vazby, kterou je nutno při použití těchto metod brát v úvahu. Doposud běžně využívanou metodou k detekci DMDS derivátů byla GC/MS, její použití je ale limitováno těkavostí analytu. Alternativou by tak mohlo být použití HPLC/MS, kde se jako běžné ionizační zdroje využívají APCI a ESI.

Pokus se standardem alkenů *cis*-9-trikosenem ukázal, že lze využít hmotnostní detekce s APCI zdrojem pro určení polohy dvojné vazby i u alkenů s použitím DMDS derivatizace.

V celkovém souhrnu lze konstatovat, že všechny cíle vytyčené pro tuto práci byly splněny.

LITERATURA

1. Rajendran L.; Simons, K.: Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* **118**, 1099-1102 (2005).
2. Mozzi R.; Burrata, S.; Gorraci, G.; : Metabolism and Functions of Phosphatidylserine in Mammalian Brain. *Neurochem. Res.* **28**, 195-214 (2003).
3. Han X.; Gross, R. W.: Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 367-412 (2005).
4. Petersen K.F.; Shulman, G. I.; : Etiology of insulin resistance. *J. Am. Med.* **119**, S10-S16 (2006).
5. Summers S. A.; : Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* **45**, 42-72 (2006).
6. Cazzoli R.; Mitchell, T. W.; Burchfield, J. G.; Pedersen, D. J.; Turner, N.; Biden, T. J.; Schmitz-Peiffer, C.: Dilinoleoyl-phosphatidic acid mediates reduced IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle cells and mouse muscle. *Diabetologia* **50**, 1732-1742 (2007).
7. Nagao K.; Yanagita, T.: Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog. Lipid Res.* **47**, 127-146 (2008).
8. Hibbeln J. R.; Salem, N.: Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1-9 (1995).
9. De Mar Jr. J. C.; Ma, K.; Bell, J. M.; Igarashi, M.; Greenstein, D.; Rapoport, S. I.; : One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J. Lipid Res.* **47**, 172-180 (2006).
10. Ogretmen B.: Sphingolipids in cancer: Regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Lett.* **580**, 5467-5476 (2006).
11. Chapkin R. S.; Seo, J.; McMurray, D. N.; Lupton, J. R.; : Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem. Phys. Lipids* **153**, 14-23 (2008).
12. Mitchell T. W.; Pham, H.; Thomas, M. C.; Blanksby, S. J.: Identification of double bond position in lipids: From GC to OzID. *J. Chromatogr. B* **877**, 2722-2735 (2009).
13. Kolektiv autorů: *Biochemie, Základní kurs*. Praha, Karolinum 2005.
14. <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip/index.htm>>, [cit 1.2. 2010]
15. Fahy E.; Subramaniam, S.; Brawn, A. H.; Glass, K. C.; Merrill, H. A.; Murphy, C. R.; Raetz, H. R. C.; Russel, W. D.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, R.; Spener, F.; Meer, G.; VanNieuwenhze, S. M.; White, H. S.; Witztum, L. J.; Dennis, A. E.: A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839-862 (2005).
16. <<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm>>, [cit 1.2. 2010]

-
17. <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/waxes/index.htm>>, [cit 29.1. 2010]
 18. Riederer M.; Müller, C.: *Biology of plant cuticle*. Blackwell Publishing (**místo vydání**)2006.
 19. Bergé J. P.; Barnathan, G.: Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. V knize *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Sv. 96, Německo, Springer 2005.
 20. Kolattukudy P. E.: *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier 1976.
 21. Bertsch A.; Schweer, H.; Titze, A.: Analysis of the labial gland secretions of the male bumble bee *Bombus perplexus* Cresson (Hymenoptera: Apidae) from North America. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **59**, 263-270 (2004).
 22. Varanasi U.; Feldman, H. R.; Malins, D. C.: Molecular basis for formation of lipid sound lens in echolocating cetaceans. *Nature* **255**, 340-343 (1975).
 23. Smith K. R.; Thiboutot, D. M.: Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid Res.* **49**, 271-281 (2008).
 24. Pflugfelder S.: Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am. J. Ophthalmol.* **137**, 337-342 (2004).
 25. Bortz J.; Wertz, P.; Downing, D.: Composition of cerumen lipids. *J. Am. Acad. Dermatol.* **23**, 845-849 (1990).
 26. Zaikin V.; Halket, J.: *A handbook of derivatives for mass spectrometry*. IM Publications (**místo vydání**) 2009.
 27. Pepe C.; Dagaut, J.; Scribe, P.; Saliot, A.: Double bond location in monounsaturated wax esters by gas chromatography/mass spectrometry of their dimethyl disulphide derivatives. *Org. Mass Spectrom.* **28**, 1356-1367 (1993).
 28. Kidwell D. A.; Biemann, K.: Determination of double bond position and geometry of olefins by mass sepectrometry of their Diels-Alder adducts. *Anal. Chem.* **54**, 2462-2465 (1982).
 29. Cervilla M.; Puzo, G.: Determination of double bond position in monounsaturated fatty acids by mass analyzed ion kinetic energy spectrometry/collision induced dissociation after chemical ionization of their amino alcohol derivatives. *Anal. Chem.* **55**, 2100-2103 (1983).
 30. McCloskey J. A.; McClelland, M. J.: Mass spectra of *O*-Isopropylidene derivatives of unsaturated fatty esters. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5090-5093 (1965).
 31. Capella P.; Zorzut, C. M.: Determination of double bond position in monounsaturated fatty acid esters by mass spectrometry of their trimethylsilyloxy derivatives. *Anal. Chem.* **40**, 1458-1463 (1968).
 32. Niehaus W. G.; Ryhage, R.: Determination of double bond positions in polyunsaturated fatty acids by combination gass chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **40**, 1840-1847 (1968).
 33. Aplin R. T.; Coles, L.: A simple procedure for localisation of ethylenic bonds by mass spectrometry. *Chem. Commun* **17**., 858-859 (1967).
 34. Audier H. E.; Bory, S.; Fetizon, M.; Longevialle, P.; Toubiana, R.: Orientation fragmentation in mass spectrometry by the introduction of functional groups. VI. Localization of ethylenic bonds.

Bull. Soc. Chim. Fr, 3034-3035 (1964).

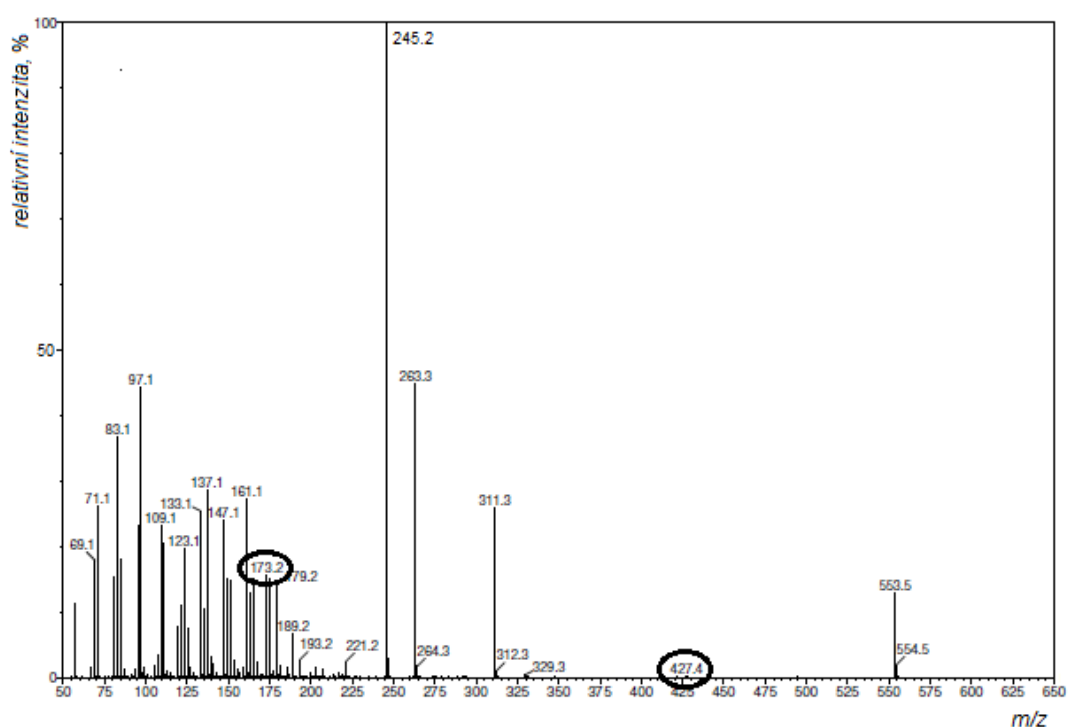
35. Oliw E.H.: Analysis of epoxyeicosatrienoic acids by gas chromatography-mass spectrometry using chlorohydrin adducts. *J. Chromatogr.* **339**, 175-181 (1985).
36. Wolff R.E.; Wolff, G.; McCloskey, J. A.: Characterization of unsaturated hydrocarbons by mass spectrometry. *Tetrahedron* **22**, 3093-3101 (1965).
37. Oliw E.H.: Analysis of 1,2-diols of linoleic, α -linolenic and arachidonic acid by gas chromatography-mass spectrometry using cyclic alkyl boronic esters. *J. Chromatogr.* **275**, 245-259 (1983).
38. Eglinton G.; Hunneman, D. H.; McCormick, A.: Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids 111. The mass spectra of the methyl esters, trimethylsilylethers of aliphatic hydroxy acids. A facile method of double bond location. *Org. Mass Spectrom.* **1**, 593-611 (1968).
39. Minnikin D. E.; Abley, P.; McQuilin, P.J.; Kusamran, K.; Maskens, K.; Polgar, N.: Location of double bonds in long chain esters by methoxymercuration-demercuration followed by mass spectroscopy. *Lipids* **9**, 135-140 (1974).
40. Lam C. H.; Lie, K. J.: Fatty acids, part 5: A study of the oxymercuration-demercuration reaction of some C₁₁-unsaturated fatty esters and methyl octadec-cis-10-en-5-ynoate. *Chem. Phys. Lipids* **16**, 181-194 (1976).
41. Shanta N.C.; Kaimal, T. N. B: Mass spectrometric location of double bonds in unsaturated fatty acids including conjugated acids as their methoxybromo derivatives. *Lipids* **19**, 971-974 (1984).
42. Buser H., R.; Arn, H.; Guerin, P.; Rauscher, S.: Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. *Anal. Chem.* **55**, 818-822 (1983).
43. Francis W. G.; Veland, K.: Alkylthiolation for determination of doublebond positions in linear alkenes. *J. Chromatogr.* **219**, 379-384 (1981).
44. Carballeira M. N.; Cruz C.: Dimethyl disulfide derivatization of ethyl (9Z, 12Z)-9,12-octadecanoate and ethyl (9E, 12E)-9,12-octadecanoate. *Chem. Phys. Lipids* **84**, 81-85 (1996).
45. Moss W. C.; Lambert-Fair, A. M.: Location of double bonds in monounsaturated fatty acids of *Campylobacter cryaerophila* with dimethyl disulfide derivatives and combined gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1467-1470 (1989).
46. Scribe P.; Guezennec, J.; Dagaut, J.; Pepe, C.; Saliot, A.: Identification of the position and the stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography/mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* **60**, 928-931 (1988).
47. Vincenti M.; Guglielmetti, G.; Cassani, G.; Tonini, C.: Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* **59**, 694-699 (1987).
48. Gross H. J.: *Mass Spectrometry*. Německo, Springer 2004.

-
49. Štulík K.; Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2005.
 50. Herbert C. G.; Johnstone, R. A. W.: *Mass spectrometry basics*. Spojené státy americké, CRC Press 2003.
 51. Hoffmann E.; Stroobant, V.: *Mass spectrometry*. 3. vyd. Velká Británie, Wiley 2007.

PŘÍLOHY

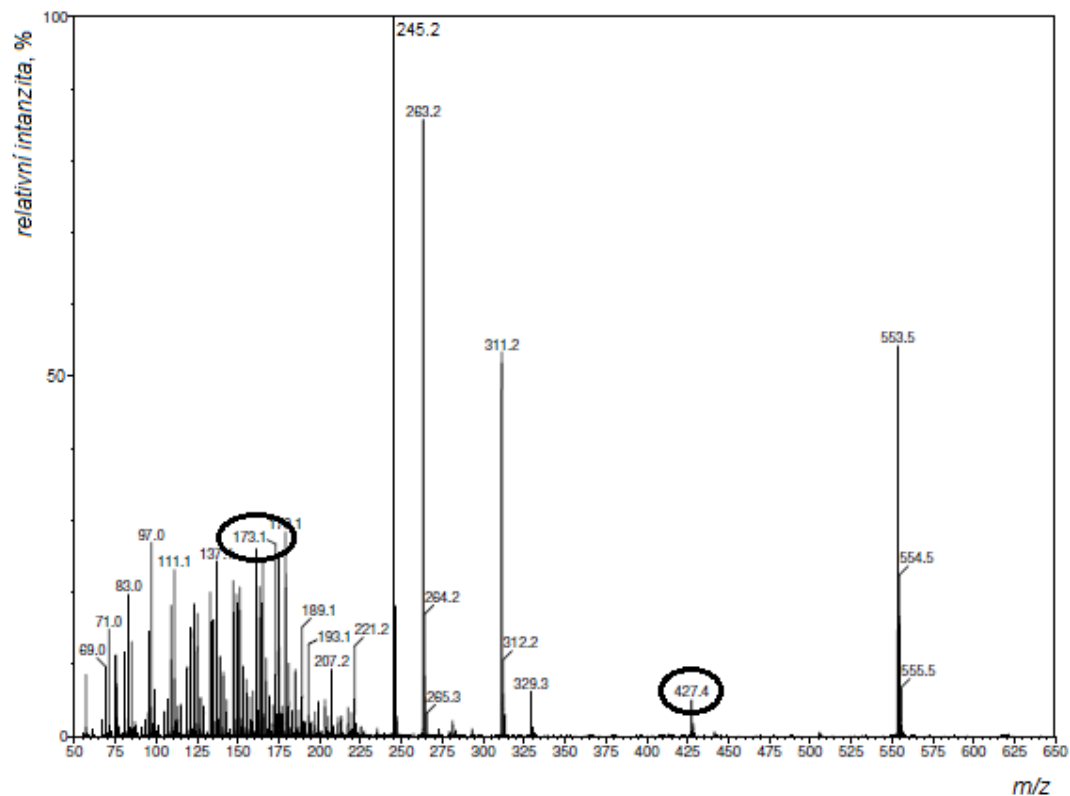
Příloha A

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



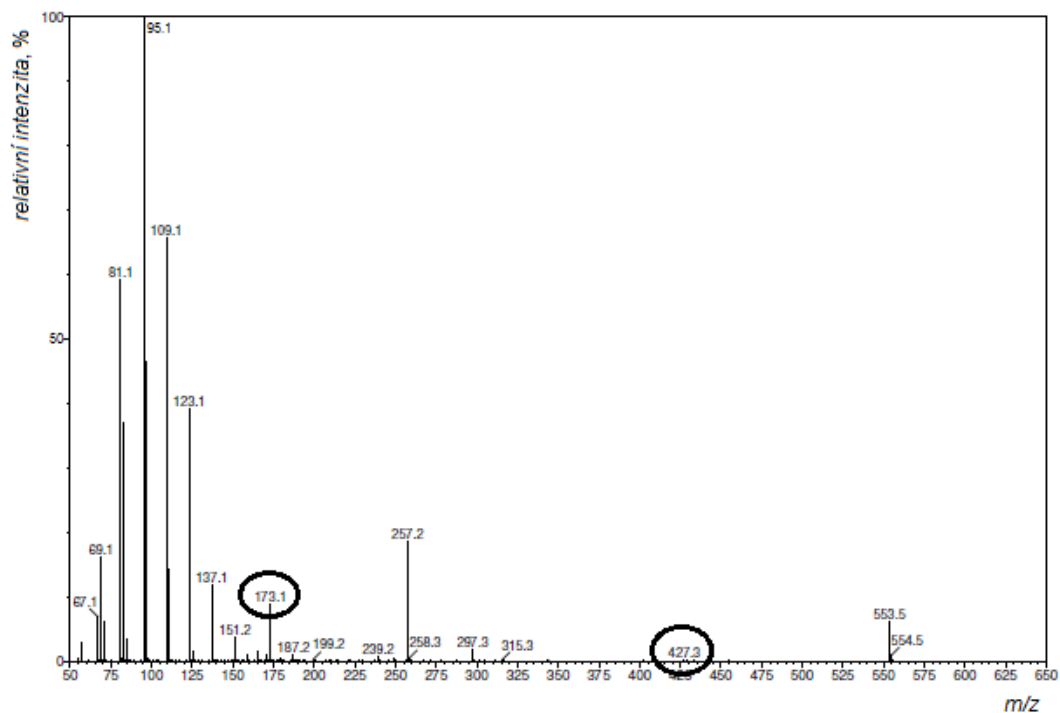
Příloha B

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.



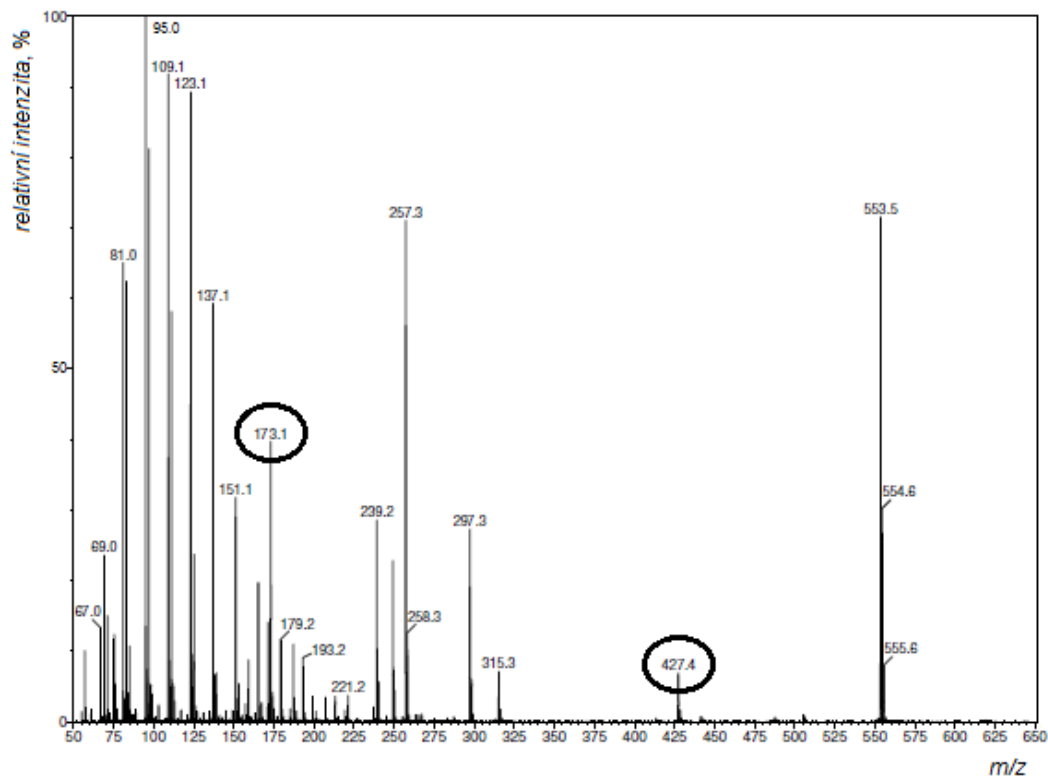
Příloha C

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-9-16:0. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



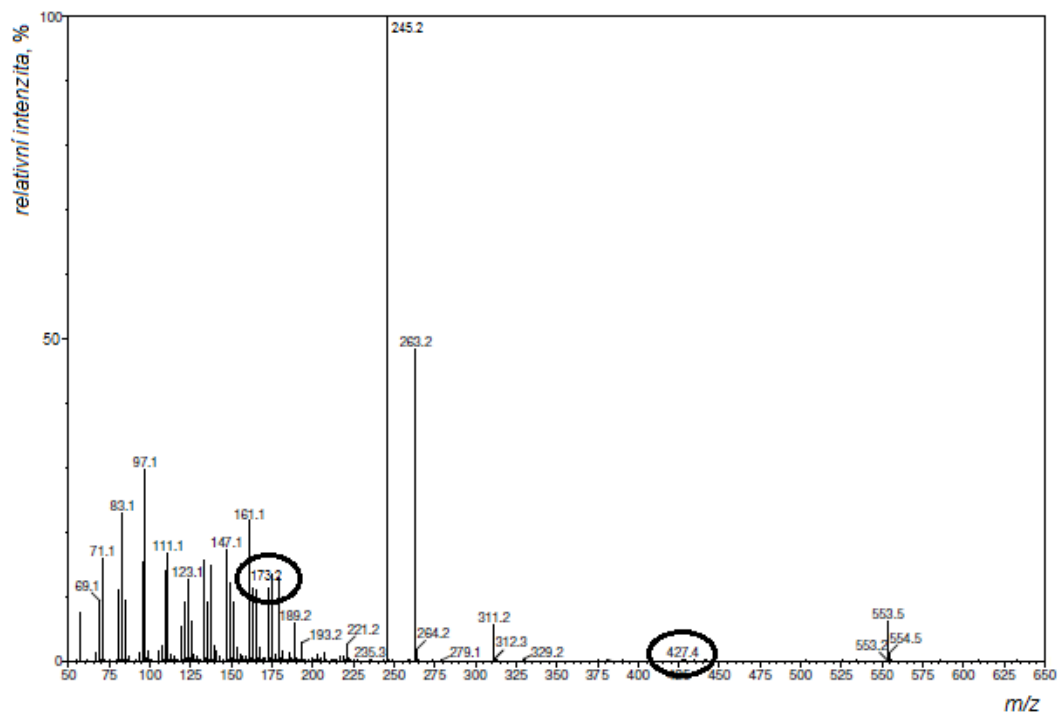
Příloha D

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-9-16:0. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.



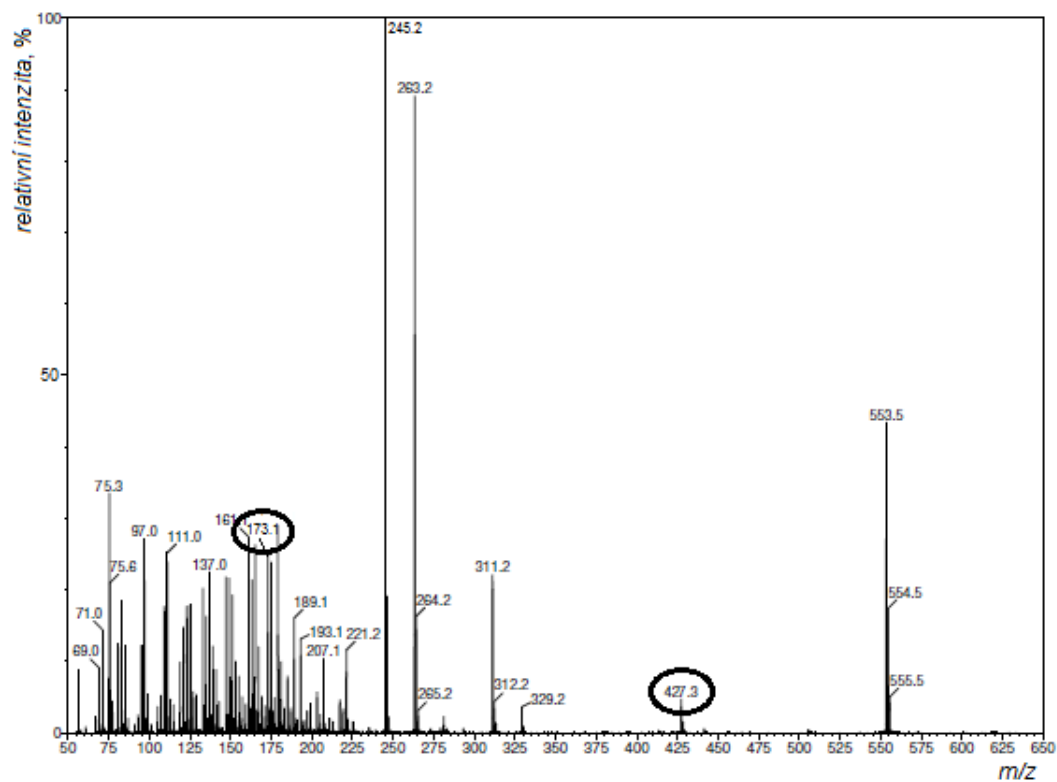
Příloha E

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9 *trans*. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Fragmentovaná m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



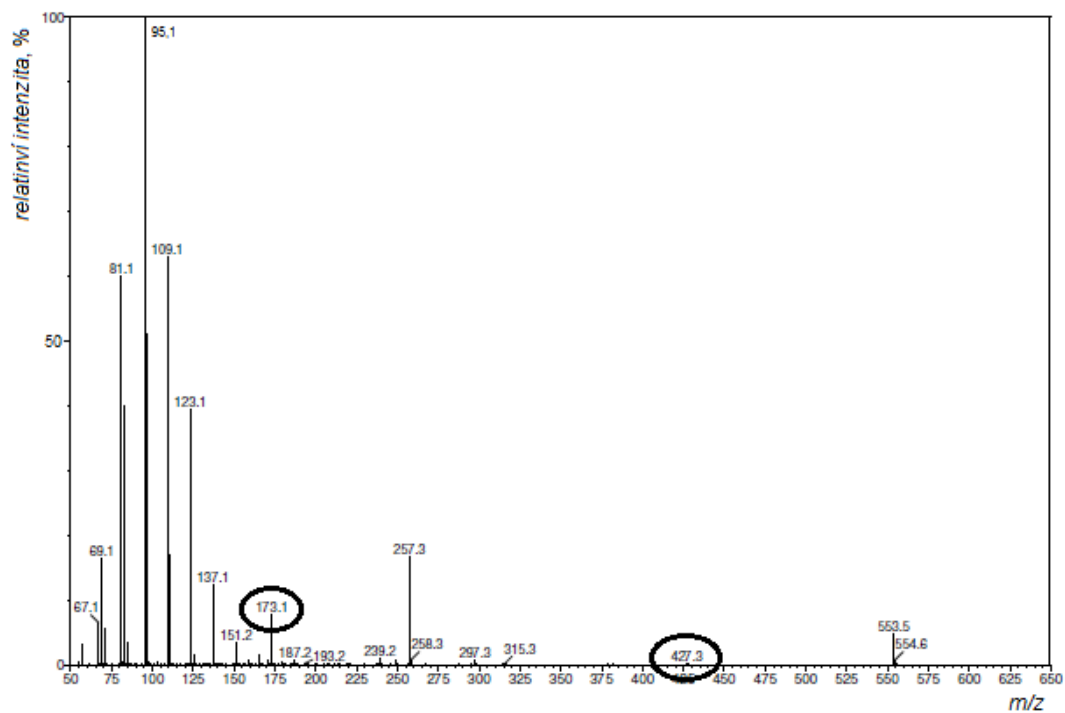
Příloha F

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 16:0-18:1n-9 *trans*. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.



Příloha G

APCI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-9 *trans*-16:0. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 553. Napětí na vzorkovacím kónusu 20 V, kolizní energie 26 eV.



Příloha H

ESI MS/MS spektrum DMDS derivátu voskového esteru 18:1n-9 *trans*-16:0. Zvýrazněny jsou signály diagnostických iontů polohy dvojné vazby. Prekurzorový ion m/z 618. Napětí na vzorkovacím kónusu 30 V, kolizní energie 30 eV.

